

BLOCAGE PHARMACOLOGIQUE ET DÉPLÉTION DE LRH-1 DANS DES MODÈLES
CELLULAIRES MURIN ET HUMAIN POUR EXPLORER SON RÔLE DANS LA
PROGRESSION TUMORALE MAMMAIRE.

par

Lysianne Papineau

Mémoire présenté au Département de biologie en vue
de l'obtention du grade de maître ès sciences (M.Sc.)

FACULTÉ DES SCIENCES
UNIVERSITÉ DE SHERBROOKE

Sherbrooke, Québec, Canada, mai 2020

Le 13 mai 2020

le jury a accepté le mémoire de Madame Lysianne Papineau dans sa version finale.

Membres du jury

Professeur Nicolas Gévry
Directeur de recherche
Département de biologie, Université de Sherbrooke

Professeur Benoît Paquette
Codirecteur de recherche
Département de médecine nucléaire et de radiologie, Université de Sherbrooke

Professeur Richard Blouin
Président-rapporteur
Département de biologie, Université de Sherbrooke

Professeur Viktor Steimle
Évaluateur interne
Département de biologie, Université de Sherbrooke

SOMMAIRE

Le cancer du sein est l'une des pathologies les plus mortelles chez les femmes. Malgré les nombreuses avancées des dernières décennies, il demeure un pourcentage de femmes qui ne peuvent bénéficier de traitements ciblés et moins agressifs telles les thérapies hormonales. En effet, les tumeurs présentant un profil triple négatif (TN) n'expriment pas les récepteurs à l'œstrogène (ER), à la progestérone (PR) et au facteur de croissance épidermique humain 2 (HER2) qui sont visés par de tels traitements. Une cible thérapeutique pour ce type de tumeur est donc toujours sujette à la recherche. Parmi de nombreuses avenues, il y a le récepteur nucléaire orphelin LRH-1 (*Liver receptor homolog-1*), lequel joue un rôle dans une variété de fonctions physiologiques et pathophysiologiques. Plus particulièrement, dans la tumorigenèse, LRH-1 est impliqué dans les processus d'initiation tumorale jusqu'à la formation de métastases. D'ailleurs, ses fonctions divergent lorsque LRH-1 est exprimé dans une tumeur TN, leur conférant un caractère plus agressif et le rendant ainsi une cible prometteuse. De plus, étant donné que la tumeur n'est pas uniquement composée de cellules cancéreuses, nous devons considérer le microenvironnement qui les entoure. Le composant le plus abondant de cet environnement est le fibroblaste activé, le CAF (*Cancer-associated fibroblast*), reconnu pour ses rôles majeurs dans la tumorigenèse. Nous tenterons donc, dans le cadre de ce projet, d'explorer davantage le rôle de LRH-1 et du sécrétome des CAFs dans la prolifération et la migration cellulaire de lignées cellulaires de carcinomes mammaires murins et humains donnés et tenterons d'évaluer s'il peut exister une relation entre les deux.

Mots-clés : Tumeur mammaire, triple négatif, LRH-1, CAF, sécrétome, prolifération, migration

REMERCIEMENTS

J'aimerais en premier lieu remercier mon directeur de recherche, le professeur Nicolas Gévry (Ph. D.) pour sa patience, sa disponibilité et ses judicieux conseils tout au long de ma maîtrise.

J'aimerais aussi remercier mon codirecteur, le professeur Benoît Paquette (Ph. D.) et mes conseillers les professeurs Richard Blouin (Ph. D.) et Viktor Steimle (Ph. D.) qui m'ont accordé leur temps pour répondre à mes questions et me guider lors de rencontres.

Je remercie bien sûr tous les membres du laboratoire, en particulier les assistantes de recherche Stéphanie Bianco (Ph. D.) et Mylène Brunelle (Ph. D.) pour m'avoir partagé leur savoir-faire technique et leurs connaissances théoriques durant ces deux ans. Merci également à Martin Morin (M. Sc.), Joannie Connell et Shirley Caron du laboratoire qui m'ont beaucoup appris et m'ont aidé à surmonter les difficultés techniques qui se sont présentées à moi.

J'aimerais remercier tous les professeurs du département de biologie de l'Université de Sherbrooke pour leurs commentaires constructifs lors de mes différentes présentations.

Je remercie spécialement Daniel Garneau (M. Sc.) pour son aide grandement appréciée avec la microscopie et Manon Dufresne pour les manipulations en salle de culture.

J'aimerais par ailleurs remercier ma famille et mes amis pour le support moral et les encouragements. Enfin, je suis reconnaissante de l'aide apportée par plusieurs membres des laboratoires du département avec qui j'ai pu fraterniser durant ses deux années.

TABLE DES MATIÈRES

Sommaire.....	iv
Remerciements.....	v
Liste des figures	ix
Liste des tableaux	xi
Liste des abréviations	xii
CHAPITRE 1. INTRODUCTION GÉNÉRALE.....	1
1.1 Le cancer du sein.....	1
1.1.1 La classification tumorale	1
1.1.2 Les sous-types basal et triple négatif.....	2
1.2 Les récepteurs nucléaires	4
1.2.1 La structure des récepteurs nucléaires.....	4
1.2.2 L'activation et le mode d'action des récepteurs nucléaires.....	5
1.3 LRH-1, un facteur de transcription important.....	6
1.3.1 Les fonctions physiologiques de LRH-1	7
1.3.2 LRH-1 dans la tumorigenèse mammaire.....	9
1.4 La tumorigenèse et le microenvironnement tumoral mammaire.....	12
1.4.1 Le fibroblaste	15
1.4.1.1 L'activation des fibroblastes.....	16
1.4.1.2 Les CAFs, des cellules polyvalentes.....	18
1.5 But du projet et hypothèses	23
CHAPITRE 2. MATÉRIEL ET MÉTHODES.....	24
2.1 Lignées cellulaires et conditions de culture	24
2.1.1 MC7-L1.....	25
2.1.2 D2A1	26
2.1.3 4T1	26
2.1.4 MDA-MB-231.....	27
2.1.5 NIH/3T3	27
2.2 ARN interférents	28
2.2.1 Préparations des plasmides	28

2.2.2 Préparation des virus.....	29
2.2.3 Infection des cellules cancéreuses.....	29
2.3 ML180 : agoniste inverse de LRH-1	30
2.4 Milieux conditionnés.....	30
2.5 Quantification de l'ARNm.....	31
2.5.1 Extraction d'ARNm	31
2.5.2 RT-qPCR.....	31
2.6 Immunobuvardage.....	32
2.7 Essais <i>in vitro</i>	34
2.7.1 Essais de prolifération.....	35
2.7.2 Essais de migration	36
2.8 Graphiques et statistiques.....	37
CHAPITRE 3. RÉSULTATS	38
3.1 Blocage pharmacologique de LRH-1	38
3.1.1 Abondance de l'ARNm de LRH-1 lors de traitements avec le ML180	38
3.1.2 Abondance protéique de LRH-1 lors de traitements avec le ML180.....	39
3.1.3 Abondance des ARNm de certains gènes cibles connus ou potentiels de LRH-1 lors de traitements avec le ML180.....	40
3.1.4 Capacité de migration des cellules cancéreuses lors de traitements avec le ML180	45
3.2 Déplétion de LRH-1 par ARN interférent.....	46
3.2.1 Abondance des ARNm de LRH-1 avec les ARNsh	47
3.2.2 Abondance protéique de LRH-1 avec les ARNsh	48
3.2.3 Abondance des ARNm de gènes cibles connus de LRH-1	50
3.2.4 Capacité de prolifération des cellules cancéreuses avec les ARNsh.....	51
3.2.5 Capacité de migration des cellules cancéreuses avec les ARNsh	55
3.3 Impact du sécrétome des fibroblastes NIH/3T3 sur les phénotypes oncogéniques des cellules cancéreuses murines.....	58
3.3.1 Capacité de prolifération des cellules cancéreuses dans du milieu de fibroblastes.....	58
3.3.2 Capacité de migration des cellules cancéreuses dans du milieu de fibroblastes et l'effet de la déplétion de LRH-1 dans de telles conditions	61
CHAPITRE 4. DISCUSSION ET CONCLUSION GÉNÉRALE.....	66
4.1 Discussion	66
4.1.1 Le blocage pharmacologique de LRH-1 avec l'agoniste inverse ML180 : un bon départ <i>in vitro</i>	66

4.1.2 La déplétion de LRH-1 à l'aide d'ARN interférents : une optimisation supplémentaire nécessaire <i>in vitro</i>	72
4.1.3 Le fibroblaste : un élément prometteur du microenvironnement tumoral	76
4.2 Conclusion générale	80
ANNEXES	81
ANNEXE A – Historique des cellules cancéreuses utilisées dans le projet de recherche	81
ANNEXE B – Informations complémentaires des ARN interférents	85
ANNEXE C – Informations complémentaires des protocoles expérimentaux	91
ANNEXE D – Sélection des ARN interférents pour la lignée murine D2A1	96
BIBLIOGRAPHIE	98

LISTE DES FIGURES

Figure 1.	Représentation de la structure primaire d'un récepteur nucléaire	5
Figure 2.	Résumé des fonctions physiologiques et pathophysiologiques de LRH-1	11
Figure 3.	Initiation tumorale d'un carcinome mammaire intra-canaire <i>in situ</i> et progression vers un carcinome mammaire <i>in situ</i> invasif	14
Figure 4.	Résumé des caractéristiques du CAF	22
Figure 5.	Schématisation des étapes du plan expérimental utilisé pour mesurer l'impact de la déplétion de LRH-1 sur les cellules	35
Figure 6.	Abondance relative de l'ARNm de LRH-1 lors de traitements au ML180.....	39
Figure 7.	Immunobuvardage de LRH-1 lors de traitements au ML180.....	40
Figure 8.	Abondance relative de l'ARNm des gènes cibles connus de LRH-1 lors de traitements au ML180.....	41
Figure 9.	Abondance relative de l'ARNm des gènes cibles connus ou potentiels de LRH-1 liés à la prolifération cellulaire lors de traitements au ML180.....	43
Figure 10.	Abondance relative de l'ARNm des gènes cibles connus ou potentiels de LRH-1 liés à la migration et l'invasion cellulaire lors de traitements au ML180.....	44
Figure 11.	Migration à travers la plaie des cellules cancéreuses lors de traitements au ML180	46
Figure 12.	Abondance relative de l'ARNm de LRH-1 des cellules cancéreuses déplétées ou non pour LRH-1	48
Figure 13.	Immunobuvardage de LRH-1 des cellules cancéreuses déplétées ou non pour LRH-1	49
Figure 14.	Abondance relative de l'ARNm des gènes cibles connus de LRH-1 liés à la prolifération cellulaire des cellules cancéreuses déplétées ou non pour LRH-1	51
Figure 15.	Prolifération en conditions normales des cellules cancéreuses humaines MDA-MB-231 déplétées ou non pour LRH-1	53
Figure 16.	Prolifération en conditions normales des cellules cancéreuses murines D2A1 déplétées ou non pour LRH-1	54
Figure 17.	Migration par chimioattraction en conditions normales des cellules cancéreuses déplétées ou non pour LRH-1	56
Figure 18.	Migration à travers la plaie en conditions normales des cellules cancéreuses murines D2A1 déplétées ou non pour LRH-1	57
Figure 19.	Prolifération des cellules cancéreuses murines D2A1 dans différents milieux de culture	59
Figure 20.	Prolifération des cellules cancéreuses humaines MDA-MB-231 dans différents milieux de culture	60

Figure 21.	Migration par chimioattraction des cellules cancéreuses avec différents milieux de culture	62
Figure 22.	Migration par chimioattraction des cellules cancéreuses déplétées ou non pour LRH-1 avec différents milieux de culture	63
Figure 23.	Migration à travers la plaie des cellules cancéreuses murines D2A1 dans différents milieux de culture et sur différents temps	64
Figure 24.	Migration à travers la plaie des cellules cancéreuses murines D2A1 déplétées ou non pour LRH-1 dans différents milieux de culture	65
Figure 25.	Présentation de la lignée murine MC7-L1	81
Figure 26.	Présentation de la lignée murine D2A1	82
Figure 27.	Présentation de la lignée murine 4T1	83
Figure 28.	Présentation de la lignée humaine MDA-MB-231	84
Figure 29.	Présentation de la lignée murine NIH/3T3	84
Figure 30.	Alignement des séquences des ARN interférents contre LRH-1	85
Figure 31.	Carte du plasmide pLKO	86
Figure 32.	Carte du plasmide pLVTHM	87
Figure 33.	Carte du plasmide pPAX2	88
Figure 34.	Carte du plasmide pMD2G	89
Figure 35.	Digestion enzymatique des plasmides pLKO, pLVTHM, pPAX2, pMD2G et les cinq candidats d'ARN interférents murins contre LRH-1	90
Figure 36.	Abondance relative de l'ARNm de LRH-1 des cellules cancéreuses murines D2A1 déplétées ou non pour LH-1 avec les cinq candidats d'ARN interférents	96
Figure 37.	Immunobuvardage contre LRH-1 des cellules cancéreuses murines D2A1 déplétées ou non pour LRH-1 avec les cinq candidats d'ARN interférents	97

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1.	Liste des ARN interférents utilisés contre LRH-1 et leur séquence cible	85
Tableau 2.	Composants détaillés pour la rétrotranscription (RT)	91
Tableau 3.	Composants détaillés du mélange pour la réaction de polymérisation en chaîne quantitative (qPCR)	91
Tableau 4.	Liste des amorces humaines utilisées pour le qPCR	92
Tableau 5.	Liste des amorces murines utilisées pour le qPCR	93
Tableau 6.	Solutions d'extraction protéique pour l'immunobuvardage.....	95

LISTE DES ABRÉVIATIONS

Ac	Anticorps
ADN	Acide désoxyribonucléique
ADNc	ADN complémentaire
AF-1/2	Fonction d'activation 1/2
AP-1	Activateur de protéine 1
ARN	Acide ribonucléique
ARNsh	ARN <i>short hairpin</i>
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
CAF	<i>Cancer-associated fibroblast</i>
CAV1	Cavéoline 1
CCL	Ligand de motif C-C
Ccnd1	Cycline D1
Ccne1	Cycline E1
Ccng1	Cycline G1
Cdh1	E-cadhérine
Cdh2	N-cadhérine
CDK	<i>Cyclin dependant kinase</i>
Cdkn1a/p21	<i>Cyclin dependant kinase inhibitor 1A</i>
CTGF	Facteur de croissance du tissu conjonctif
CXCL	Ligand de motif C-X-C
CYP7A1	Cytochrome P450
DBD	<i>DNA Binding Domain</i>
DMEM	<i>Dulbecco Modified Eagle Medium</i>
DMSO	Diméthylsulfoxyde
dNTP	Nucléotides triphosphates
DTT	Dithiothreitol
EGF	Facteur de croissance épidermique
EGFR	Récepteur au facteur de croissance épidermique
ER	Récepteur de l'œstrogène
ER α	Récepteur alpha aux œstrogènes
EDTA	Acide éthylènediaminetetraacétique
EGTA	Acide éthylèneglycol-bis-(amino-2-éthyléther)- N,N,N',N'-tétraacétique
FAP	Protéine d'activation de fibroblaste
FBS	<i>Fetal Bovine Serum</i>
FC	Facteur de croissance
FGF	Facteur de croissance des fibroblastes
FSP-1	Protéine spécifique de fibroblaste 1
FT	Facteur de transcription
Greb1	<i>Growth regulating estrogen receptor binding-1</i>

HDAC2	Histone désacétylase 2
HEPES	4-(2-hydroxyéthyl)-1-piperazineéthanesulfonique
HER2	Récepteur du facteur de croissance épidermique humain 2
HGF	Facteur de croissance de l'hépatocyte
IGF	Facteur de croissance similaire à l'insuline
IL-6	Interleukine 6
IP	Inhibiteurs de phosphatase
J#	Jour #
kb	Kilobases
KCl	Chlorure de potassium
kDa	Kilodaltons
LOX	Lysyl oxydase
M	Moles
MEC	Matrice extracellulaire
MMLV	<i>Moloney Murine Leukemia Virus</i>
MMP	Métallopeptidase matricielle
MPA	Acétate de médroxyprogestérone
mL	Millilitres
mM	Millimoles
N	Réplicat biologique
n	Réplicat technique
NaCl	Chlorure de sodium
Nd	Non digéré
No	Numéro
NR5A1 / SF-1	Facteur stéroïdogénique 1
NR5A2 / LRH-1	<i>Liver receptor homolog-1</i>
N/A	Non applicable
PBS	Solution saline de phosphate
PDGF	Facteur de croissance dérivé des plaquettes
PEI	Polyéthylénimine
PMSF	Fluorure de phénylméthylsulfonyl
PR	Récepteur de la progestérone
Pu	Purine
Py	Pyrimidine
qPCR	Réaction de polymérisation en chaîne quantitative
RN	Récepteur nucléaire
ROS	Espèces réactives d'oxygène
RT	Rétrotranscription
SDS	Dodécyl sulfate de sodium
SEM	Erreur type de la moyenne
shCTRL	ARNsh humain contrôle
shCtrl	ARNsh souris contrôle
shNR5A2 #1-2	ARNsh humain contre LRH-1
shNr5a2 #1-2	ARNsh souris contre LRH-1
SMA- α	Actine alpha de muscle lisse
TBP	Protéine à boîte TATA
TEM	Transition épithélio-mésenchymatale

TGF- β	<i>Transforming growth factor beta</i>
TGM	Transglutaminase
TN	Triple négatif
TNC	Ténascine C
Tris	Trisaminométhane
T° A	Température ambiante
UdeS	Université de Sherbrooke
V	Volts
VEGF	Facteur de croissance vasculaire endothéliale
Vim	Vimentine
μg	Microgrammes
μL	Microlitres
μM	Micromoles
%	Pourcentage
°C	Degré Celsius

CHAPITRE 1

INTRODUCTION GÉNÉRALE

1.1 Le cancer du sein

Le cancer du sein figure au premier rang des types de cancers chez la femme (Bray et al, 2018 ; Ferlay et al, 2015 ; Siegel et al, 2019). Cette pathologie démontre une très forte hétérogénéité qui apporte une limitation dans l'application des traitements. En effet, la classification des tumeurs mammaires est ardue et toujours sujette à des clarifications avec l'avancement des études. Toutefois, celle-ci est importante pour une meilleure compréhension de la tumorigenèse mammaire et l'association à des facteurs cliniques clés pour l'application de thérapies adéquates.

1.1.1 La classification tumorale

Cette classification a pour but d'identifier des marqueurs permettant d'associer certains facteurs cliniques comme, par exemple, la survie, la rechute de la maladie ou la résistance thérapeutique (Lam et al, 2014). Des études répétées ont permis de séparer les tumeurs mammaires en cinq sous-types phénotypiques moléculaires basés sur la signature génique d'échantillons cliniques (Hu et al, 2006 ; Perou et al, 2000 ; Sørlie et al, 2001 ; Sørlie et al, 2003). Ces sous-types ont été confirmés dans d'autres études qui se sont plutôt penchées sur l'identification de biomarqueurs en immunohistochimie (Abd El-Rehim et al, 2005 ; Blows et al, 2010 ; Diallo-Danebrock et al, 2007 ; Nielsen et al, 2004). Les marqueurs principalement utilisés pour discriminer les différents sous-types sont les récepteurs hormonaux pour l'œstrogène (ER) et

pour la progestérone (PR) ainsi que la présence d'une surexpression du récepteur du facteur de croissance épidermique humain 2 (HER2) ou une amplification de son gène *HER2*, en plus de diverses cytokératines (Blows et al, 2010 ; Nielsen et al, 2004). Le consensus actuel permet de classer les tumeurs mammaires selon les sous-types phénotypiques luminaux A, B/HER2+, B/HER2-, le sous-type basal et celui d'allure normale (Perou et al, 2000), en plus d'un potentiel sixième type dit *claudin-low* qui partage beaucoup de caractéristiques avec les cellules souches (Herschkowitz et al, 2007 ; Prat et Perou, 2011).

Les sous-types luminaux sont homogènes sur plusieurs niveaux comme leur signature génique, un meilleur pronostic en général et l'application adéquate des thérapies moins agressives sur les patientes comme les traitements hormonaux ou ceux ciblant HER2 (Brenton et al, 2005 ; Waks et Winer, 2019). Alors que le sous-type d'allure normal ne pourrait être qu'un artefact technique (Parker et al, 2009), le sous-type basal, quant à lui, nécessite une meilleure hiérarchisation ainsi qu'une thérapie ciblée pour ces tumeurs (Badve et al, 2011 ; Irvin et Carey, 2008 ; Lam et al, 2014). En effet, cette classification peut encore être sujette à des changements par la découverte de nouveaux petits sous-groupes permettant de raffiner notre compréhension de la maladie et l'application des traitements.

1.1.2 Les sous-types basal et triple négatif

Le sous-type phénotypique basal représente 10-20 % des tumeurs mammaires selon diverses études faites dans des populations données (Bauer et al, 2007 ; Blows et al, 2010 ; Carey et al, 2006 ; O'Brien et al, 2010). Ces tumeurs possèdent des caractéristiques plutôt conservées telles l'absence ou la sous-expression de ER, PR et HER2 et la surexpression de gènes retrouvés normalement dans les cellules épithéliales basales ou myoépithéliales comme des cytokératines 5/6 et le récepteur au facteur de croissance épidermique (EGFR) (Perou et al, 2000 ; Sørli et al, 2001). Elles vont aussi être associées à un plus haut grade histologique et un haut indice de

Ki-67, ce qui signifie que ce sont des tumeurs très peu différenciées et malignes et donc présentant un haut taux mitotique (Badve et al, 2011 ; Foulkes et al, 2010). Elles sont généralement associées à un mauvais pronostic, entre autres dû à une pauvre réponse à la chimiothérapie (Fountzilias et al, 2012), à une prévalence plus importante chez les jeunes femmes (< 50 ans) (de Ronde et al, 2010), ainsi qu'une plus forte association aux mutations du gène *BRCA1* (de Ronde et al, 2010 ; Foulkes et al, 2004) ou *P53* (Sørli et al, 2001 ; Troester et al, 2006), des suppresseurs tumoraux bien connus.

Toujours à des fins de diagnostic et de choix des traitements applicables en clinique, le terme triple négatif (TN) a commencé à être utilisé afin de désigner une tumeur qui exprime peu ou pas du tout ER, PR et HER2 (Brenton et al, 2005). Bien que la grande majorité des cancers du sous-type basal sont TN et vice versa (Bertucci et al, 2008), il existe tout de même une discordance d'environ 30 % entre les deux profils (de Ronde et al, 2010 ; Kreike et al, 2007; Parker et al, 2009). Les deux appellations ne sont donc pas des synonymes même si certains groupes les considèrent comme tels (Rakha et al, 2008a). D'ailleurs, les tumeurs TN présentent une plus forte hétérogénéité au niveau génétique que ne peuvent l'être les types luminaux (Turner et al, 2010). En effet, les tumeurs TN peuvent se retrouver dans tous les sous-types moléculaires, incluant le fameux sous-type dit *claudin-low* où elles correspondent à une majorité dans cette catégorie (Sotiriou et Pusztai, 2009 ; Weigelt et al, 2010).

Ici, nous nous intéresserons davantage aux tumeurs dites TN par les critères déjà mentionnés, soit l'absence ou la sous-expression de ER, PR et HER2. Les tumeurs TN représentent environ 15 % de toutes les tumeurs invasives (Rakha et al, 2008 b ; Reis-Filho et Tutt, 2008). Tout comme le sous-type basal, les tumeurs TN sont associées à un très mauvais pronostic. D'une part du fait qu'il n'existe aucun traitement ciblé pour ces patientes qui vont devoir avoir recours qu'aux traitements de radiothérapie ou chimiothérapie, des thérapies plus agressives pour l'organisme. Depuis les dernières décennies, plusieurs études sont en branle pour trouver une

cible thérapeutique pour ces patientes et certaines montrent un intérêt particulier pour les récepteurs nucléaires (RNs) (Aesoy et al, 2015 ; Doan et al, 2017 ; Muscat et al, 2013).

1.2 Les récepteurs nucléaires

Les RNs sont une très grande famille de protéines régulatrices de la transcription. Ils régulent une multitude de voies physiologiques et pathophysiologiques (Doan et al, 2017 ; Fayard et al, 2004). Chez l'humain, il existe 48 membres de RNs, divisés en six superfamilles (NR0-NR6) (Fayard et al, 2004), qui présentent une structure et une fonctionnalité bien conservées à travers l'évolution (Mangelsdorf et al, 1995).

1.2.1 La structure des récepteurs nucléaires

La structure grandement conservée des RNs consiste en quatre domaines (Giguère et al, 1986 ; Kumar et al, 1987 ; Mangelsdorf et al, 1995). Comme présenté dans la figure 1, de l'extrémité N-terminale à la C-terminale, il y a d'abord le domaine A/B qui contient la première fonction d'activation (AF-1) qui consiste en des sites de phosphorylation pour une kinase. C'est ce domaine qui peut être reconnu par les coactivateurs et/ou d'autres facteurs de transcription (FT) (Gronemeyer et al, 2004). Suit le domaine de liaison à l'ADN (DBD/C), composé de deux doigts de zinc chez tous les RNs, qui précède une région charnière (D) permettant le repliement de la protéine. Finalement, le dernier domaine (E) consiste en une poche hydrophobe qui contient la deuxième fonction d'activation qui est dépendante d'un ligand (AF-2) et est critique pour l'interaction des corégulateurs transcriptionnels ou des complexes de remodelage de la chromatine (Gronemeyer et al, 2004).

primordial dans leurs interactions. En effet, la liaison d'un ligand va modifier la conformation du RN pour permettre son interaction avec ses partenaires (Sever et Glass, 2013). Ces molécules sont majoritairement des petits ligands lipophiles comme des hormones, des métabolites ou des ligands synthétiques, en plus des acides rétinoïdes, d'oxystéroles et d'hormones thyroïdiennes (Fayard et al, 2004 ; Mangelsdorf et al, 1995). Le changement de conformation permet au RN de se dissocier de ses corépresseurs pour lier ses coactivateurs. Ces coactivateurs sont des FTs ou, majoritairement, de gros complexes qui agissent comme modulateurs chromatiniens (Millard et al, 2013). En modifiant la chromatine, ils permettent de libérer ou séquestrer des régions promotrices ou régulatrices qui modulent de cette façon la transcription des gènes (Fayard et al, 2004 ; Millard et al, 2013).

On parle de RN orphelin lorsque le ligand n'a pas encore été identifié (Doan et al, 2017). Les RNs orphelins représentent, à ce jour, 50 % des RNs que l'on connaît (Burris et al, 2013). On parle souvent d'une activité constitutive de ces RNs, car ils semblent qu'aucun ligand endogène ou synthétique ne soit nécessaire à leur activité basale, malgré la présence, dans la structure du récepteur, d'une poche hydrophobe qui pourrait contenir le domaine de liaison ligand-dépendant (Ingraham et Redinbo, 2005). Parmi eux, l'un fera l'objet de cette étude, le récepteur NR5A2.

1.3 LRH-1, un facteur de transcription important

Le RN orphelin NR5A2 ou LRH-1 (*Liver Receptor Homolog-1*), appartient à l'une des six sous-familles, soit la FTZ-F1/NR5 portant le nom du premier homologue cloné provenant de la drosophile (Ftz-F1/NR5A3) (Fayard et al, 2004 ; Segraves, 1991). LRH-1 a porté plusieurs noms par le passé puisqu'il a été isolé indépendamment par plusieurs groupes. Selon l'origine de sa découverte ou la fonction observée, il a été identifié chez l'humain comme le FT α -fetoprotéine (Galarneau et al, 1998), le récepteur homologue du pancréas (Becker-André et al, 1993), le facteur de liaison B1 (Li et al, 1998) et le FT du promoteur de CYP7A1

(Cytochrome P450) (Nitta et al, 1999). Le consensus actuel s'est arrêté à LRH-1. Il n'existe qu'un seul homologue mammalien à LRH-1 et c'est le facteur stéroïdogénique 1 (SF-1/NR5A1), qui partage les mêmes éléments de réponses, mais ont des patrons d'expression qui diffèrent au niveau spatial et temporel (Fayard et al 2004). Cette superfamille se caractérise par leur séquence consensus, leur dimérisation majoritaire et la nature des gènes régulés.

Comme mentionné précédemment, les RNs peuvent être identifiés selon leur séquence de reconnaissance à l'ADN. Ici, la sous-famille NR5 est caractérisée par la boîte Ftz-F1 conservée chez les trois RN, soit LRH-1, SF-1 et Ftz-F1 (Galarneau et al, 1996), reconnaissant la séquence consensus 5'-PyCA AGG PyCPu-3' (où Py désigne une pyrimidine) avec une grande affinité comme monomère (Ueda et al, 1992). LRH-1 est l'un de ces RNs qu'on dit avoir une activité transcriptionnelle constitutive, c'est-à-dire qu'il est continuellement actif sans la présence apparente d'un ligand (Fayard et al, 2004). En effet, des études ont initialement identifié une poche hydrophobique anormalement grande et vide chez LRH-1 et une conformation moléculaire qui semble constamment en position active (Desclozeaux et al, 2002 ; Sablin et al, 2003). Mais, certaines études ont démontré, par la suite, la présence d'un phospholipide bactérien dans l'énorme poche lors du clonage de la forme humaine ou murine du RN dans une bactérie (Krylova et al, 2005 ; Ortlund et al, 2005 ; Wang et al, 2005). Ceci laisse à penser que LRH-1 pourrait nécessiter un ligand comme d'autres RN, tels ER ou PR, afin d'augmenter son activité.

1.3.1 Les fonctions physiologiques de LRH-1

Les fonctions de LRH-1 peuvent se comparer avec celles retrouvées chez les autres membres de sa sous-famille. Par exemple, son homologue chez la drosophile ; Ftz-F1 est un régulateur du gène homéotique *ftz* nécessaire pour la segmentation lors du développement (Lavorgna et al, 1991) et est prérequis aux réponses induites par l'ecdysone, une hormone stéroïdienne chez les

insectes, afin de terminer normalement la métamorphose (Broasdus et al, 1999). Quant à SF-1, il est essentiel au développement adéquat des tissus stéroïdogéniques, puisqu'il est exprimé dans les précurseurs des gonades ainsi que les glandes surrénales et que sa délétion dans la souris résulte en une absence de ces organes (Luo et al, 1994). Il est également exprimé dans les ovaires, où il participe à l'ovulation par son activité stéroïdogénique dans les cellules de thèques des follicules ovariens (Boerboom et al, 2000 ; Falender et al, 2003). De son côté, LRH-1, tout comme ses deux homologues, est impliqué dans le développement et la stéroïdogénèse, mais également dans plusieurs autres voies physiologiques.

LRH-1 est essentiel au développement embryonnaire des organes endodermiques, c'est-à-dire les intestins, le foie ainsi que les pancréas endocrine et exocrine (Annicotte et al, 2003 ; Cobo et al, 2018 ; Rausa et al, 1999). En effet, une souris délétée pour LRH-1 (Nr5a2^{-/-}) est létale aux stades précoces de l'embryogenèse (Paré et al, 2001) puisque ces organes ne peuvent pas se développer normalement. Ce RN est également impliqué dans le développement du cerveau (Grgurevic et al, 2005 ; Stergiopoulos et Politis, 2016). Chez l'individu mature, LRH-1 conserve une expression localisée dans ces mêmes organes à l'exception de sa perte dans le pancréas endocrine et la séquestration de son expression dans les cryptes de Lieberkühn dans les intestins, et l'addition d'une expression continue dans l'épithélium gastrique (Fernandez-Marcos et al, 2011 ; Rausa et al, 1999). De plus, LRH-1 est aussi exprimé dans le stroma des glandes mammaires, particulièrement au niveau du tissu adipeux non différencié, suggérant un rôle dans la différenciation des préadipocytes (Clyne et al, 2002).

Outre son implication dans la différenciation de tissus endodermiques et/ou stéroïdogéniques, LRH-1 joue un rôle important dans les fonctions physiologiques de ces organes chez l'adulte. En effet, il est impliqué dans l'homéostasie du cholestérol en régulant son transport inversé, la synthèse de l'acide biliaire et sa circulation entérohépatique (Francis et al, 2003 ; Lee et Moore, 2008 ; Repa et Mangelsdorf, 1999). Ce RN joue aussi un rôle important contre l'inflammation intestinale en tant que médiateur de la synthèse de glucocorticoïdes (Coste et al, 2007 ; Huang

et al, 2014) et en participant aux fonctions des macrophages (Lefèvre et al, 2015). LRH-1 est également exprimé dans les glandes surrénales (Wang et al, 2001) et dans les cellules de la granulosa des follicules ovariens (Boerboom et al, 2000 ; Falender et al, 2003 ; Hinshelwood et al, 2003 ; Kim et al, 2004 ; Liu et al, 2003) où il est impliqué dans la stéroïdogenèse, comme son homologue SF-1 (Sirianni et al, 2002, Bianco et al, 2019). LRH-1 est ainsi indispensable à l'ovulation (Duggavathi et al, 2008). De plus, il est aussi exprimé dans le corps blanc et le placenta (Zhang et al, 2013), participant au maintien de la grossesse. Finalement, plus récemment LRH-1 a été retrouvé dans les lymphocytes T avec une plus faible expression, mais toutefois nécessaire à leur bon fonctionnement (Schwaderer et al, 2017). LRH-1 est donc très important au développement ainsi que pour plusieurs fonctions essentielles au fonctionnement adéquat de l'organisme et à la procréation chez la femme (Fayard et al, 2004 ; Meinsohn et al, 2019). Toutefois, LRH-1 est aussi impliqué dans certaines pathologies liées aux organes où il opère ainsi que dans les processus tumorigéniques.

1.3.2 LRH-1 dans la tumorigenèse mammaire

LRH-1 est exprimé dans plusieurs cancers comme celui du pancréas (Benod et al, 2011), du foie (Xu et al, 2016), des intestins (Bayrer et al, 2015 ; Schoojans et al, 2005), de l'estomac (Wang et al, 2008), des ovaires (Lazarus et al, 2012), de la prostate (Wang et al, 2018a) ainsi que du sein (Miki et al, 2006). Dans le cancer du sein, il est fortement exprimé dans environ 45 % des cas (Miki et al, 2006) et sa localisation à l'intérieur de la tumeur est autant au niveau des cellules cancéreuses que des cellules stromales adjacentes (Annicotte et al, 2005), alors que son expression est très faible dans la glande mammaire saine à l'exception des préadipocytes. Son expression corrèle avec le degré invasif et métastatique de la tumeur de même qu'avec l'agressivité et la résistance aux traitements (Bianco et al, 2014a ; Chand et al, 2010 ; Nadolny et Dong, 2015 ; Pang et al, 2017 ; Wang et al, 2018a).

LRH-1 joue des rôles très différents selon le contexte moléculaire du cancer du sein. Pour les cancers œstrogéniques, il a été montré en lien étroit avec ER alpha (ER α) en étant, d'une part, un gène cible de ce dernier (Annicotte et al, 2005) et en ayant, d'autre part, des gènes cibles communs associés à la prolifération cellulaire (Bianco et al, 2014 b ; Chand et al, 2012). En effet, lorsque LRH-1 est déplété dans une lignée cellulaire ER+, la prolifération induite par l'œstrogène, l'expression même de ER α et ses gènes cibles sont aussi réduits (Annicotte et al, 2005 ; Thiruchelvam et al, 2011). Alors que lorsque ER α n'est pas exprimé par la tumeur, LRH-1 présente une activité transcriptionnelle différente. En effet, on retrouve plus de gènes liés à la migration et l'invasion cellulaire transcrit par LRH-1 dans une tumeur TN ce qui contribue à leur caractère agressif (Bianco et al, travaux en cours). LRH-1 est corrélé à l'augmentation de la motilité cellulaire, de l'invasion et de la formation de colonie puisque sa déplétion réduit ces propriétés alors qu'une surexpression les augmente (Chand et al, 2010 ; Lazarus et al, 2012).

Dans les adipocytes environnants de la glande mammaire, LRH-1 régule la transcription du cytochrome P450 (aussi connu sous le nom de l'aromatase), une protéine critique pour la conversion des androgènes en œstrogènes (Clyne et al, 2002 ; Clyne et al, 2004 ; Zhou et al, 2005). L'augmentation de la transcription de cette protéine permet l'augmentation de l'œstrogène dans le microenvironnement, ce qui facilite la prolifération des tumeurs exprimant ER (Lazarus et al, 2012). Ce phénomène se produit également au niveau des cellules épithéliales et stromales de la glande mammaire (Bouchard et al, 2005 ; Miki et al, 2007). LRH-1 permet la résistance à la chimiothérapie en augmentant la transcription de MDC1, une protéine participant à la réparation de l'ADN. De cette manière, les cellules se protègent davantage contre la mort cellulaire qui est provoquée par les produits chimiques utilisés en chimiothérapie (Wang et al, 2018b). Dans la tumeur mammaire, LRH-1 induit également l'expression de la métallopeptidase matricielle 9 (MMP9) qui va cliver la protéine E-cadhérine, une observation déjà rapportée dans l'ovaire (Chand et al, 2010 ; Duggavathi et al, 2008). De plus, il influence également le remodelage de l'actine ce qui, combiné ensemble, suggère un rôle important du RN dans la transition épithélio-mésenchymale (TEM) (Lazarus et al, 2012).

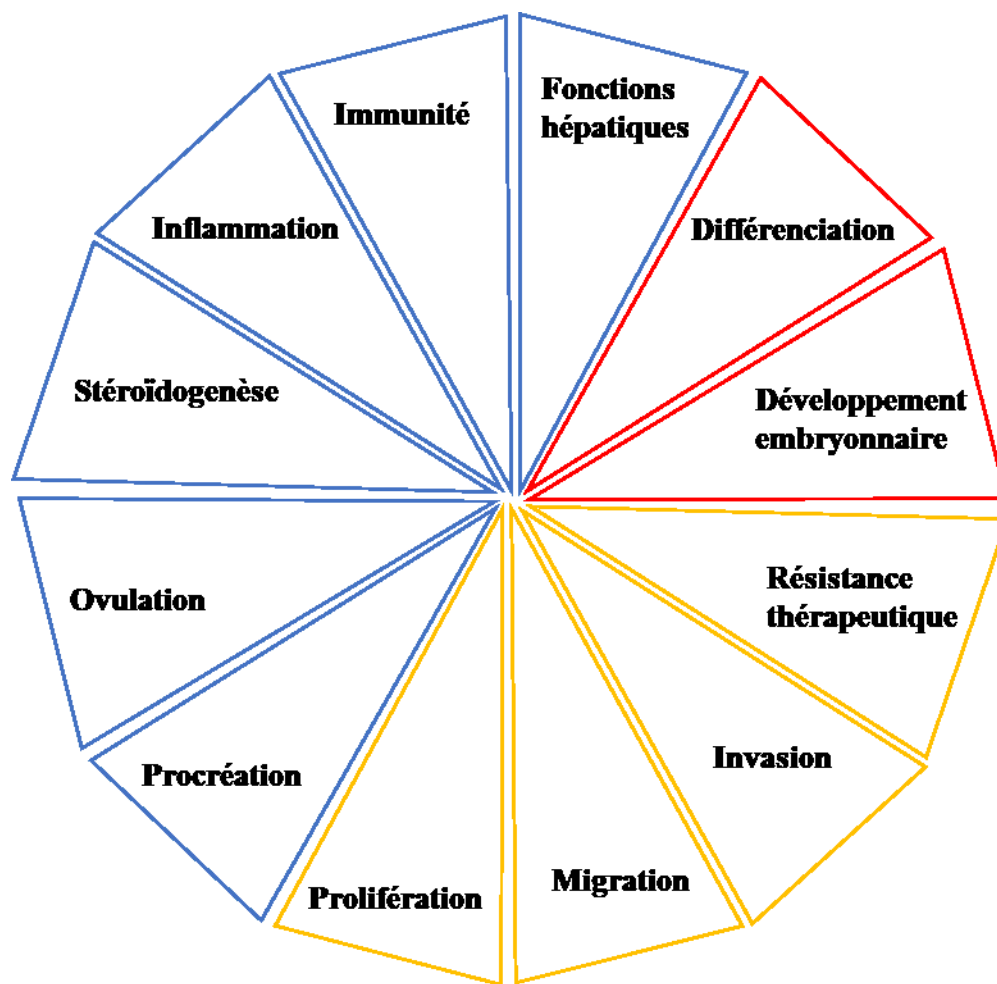


Figure 2 : Résumé des fonctions physiologiques et pathophysiologiques de LRH-1.

Schématisation simplifiée des fonctions physiologiques et pathophysiologiques de LRH-1. Inspiré et adapté de Stein et Schoonjans (2015). En bleu les fonctions physiologiques, en rouge les fonctions liées au développement et en jaune les fonctions liées à la tumorigénèse.

1.4 La tumorigenèse et le microenvironnement tumoral mammaire

Les mutations sont des événements qui arrivent très fréquemment lors de la réplication de l'ADN. Ceci peut se reproduire de façon toute à fait fortuite ou peut être provoqué par des perturbateurs endogènes ou exogènes qui provoquent des altérations de l'ADN. Plusieurs altérations sont souvent inoffensives, puisque la substitution d'un nucléotide peut ne pas avoir d'impacts sur le codon ou bien la substitution d'un acide aminé n'a pas d'impacts sur la structure protéique finale. Toutefois, l'accumulation de ces événements augmente la prévalence d'une mutation génétique amenant un changement majeur sur la structure d'une protéine et peut avoir, ainsi, des effets positifs ou négatifs sur la cellule. Une modification structurale peut amener la défaillance d'une protéine ou modifier ses fonctions de façon bénéfique ou non. L'accumulation dans le temps de ces mutations est d'ailleurs la cause, avec la reproduction sexuée, de la diversité de la vie, mais est aussi la cause des cancers. En effet, une cellule est considérée cancéreuse dès que les mutations qu'elle a accumulées au niveau de plusieurs gènes lui confèrent un phénotype oncogénique. Par exemple, la protéine la plus souvent mutée dans les cancers est P53, un suppresseur tumoral, dont le dérèglement va favoriser la transformation oncogénique (Freed-Pastor et Prives, 2012). Une fois transformée, la cellule cancéreuse va proliférer et influencer son environnement direct à son avantage. Les changements qui surviennent autour de la masse cellulaire tumorale vont créer un microenvironnement tumoral qui est souvent décrit comme une blessure qui ne guérit jamais.

Sur le plan histologique, la glande mammaire saine est composée d'un stroma séparant les canaux de cellules épithéliales, bordés par un abondant tissu adipeux. Le stroma est composé de la membrane basale des cellules épithéliales, de fibroblastes, de cellules immunitaires en dormance, de cellules musculaires lisses, de cellules endothéliales et péricytes qui forment les vaisseaux et les capillaires sanguins et lymphatiques, ainsi que la matrice extracellulaire (MEC) (Kalluri et Zeisberg, 2006). L'interaction entre toutes ces cellules contribue à l'initiation, la croissance et la propagation des tumeurs mammaires (Balkwill et al, 2012). Ces relations sont

multiples, complexes et encore sujettes à une meilleure compréhension. Si l'on décortique une masse tumorale mammaire, on se rend compte que la majorité des composants de la masse sont des cellules stromales et non pas les cellules cancéreuses (Balkwill et al, 2012). Il est donc important de considérer une tumeur comme une masse très hétérogène au niveau cellulaire, et donc considérer plusieurs joueurs lorsqu'on étudie les processus tumorigéniques.

Pour illustrer au mieux le processus de formation d'une tumeur mammaire, nous préférons utiliser le cas d'un carcinome intra-canaire *in situ*, l'un des plus fréquents avec près d'un quart des nouveaux diagnostics aux États-Unis (Kerlikowske, 2010). Comme son nom l'indique, l'origine de la tumeur provient d'une cellule épithéliale dans l'organe qui devient oncogénique et prolifère de façon aberrante à l'intérieur des canaux de la glande mammaire. Ces cellules sécrètent de nombreux composés qui traversent la membrane basale et influencent le stroma situé de part et d'autre du canal où elles se multiplient. Ainsi, les cellules cancéreuses vont modifier le stroma environnant, le rendant propice à leur propre expansion ; produisant une desmoplasie (Kalluri et Zeisberg, 2006). Au fur et à mesure que les cellules cancéreuses augmentent en nombre, le stroma modifié devient de plus en plus volumineux. L'interaction entre les cellules cancéreuses et les fibroblastes contribue mutuellement à leur expansion respective (Angelucci et al, 2012 ; Bhowmick et al, 2004). La membrane basale, séparant le nouveau microenvironnement malin qui s'est construit entre le reste du stroma et les cellules cancéreuses, voit ses protéines clivées par des protéases produites et sécrétées par les cellules cancéreuses ce qui ouvre un passage permettant leur expansion à l'extérieur des canaux mammaires. On peut décrire à ce point la tumeur comme étant invasive et elle peut, avec plus de facilité, former des métastases si les cellules cancéreuses rejoignent la circulation sanguine et/ou lymphatique.

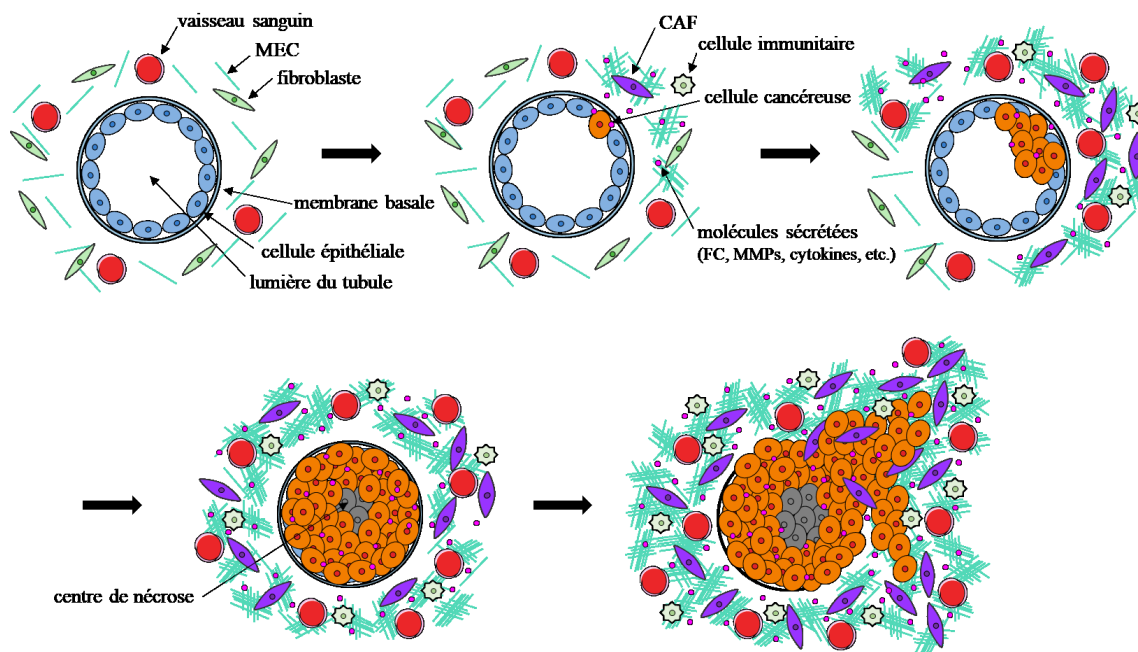


Figure 3 : Initiation tumorale d'un carcinome mammaire intra-canaulaire *in situ* et progression vers un carcinome mammaire *in situ* invasif.

Schématisation de la progression tumorale d'un carcinome intra-canaulaire vers un carcinome invasif. Inspiré et adapté de Santi et al (2018). MEC, matrice extracellulaire; CAF, *cancer-associated fibroblast*; FC, facteur de croissance; MMPs, métalloprotéases matricielles.

Les événements qui surviennent lors du processus tumorigénique comme décrit plus haut sont nombreux. L'activation des fibroblastes est l'un des facteurs les plus critiques, puisque c'est ce changement phénotypique qui amène la réponse desmoplasique (Kalluri et Zeisberg, 2006). Le sécrétome oncogénique des cellules cancéreuses couplé aux sécrétomes de ces nouveaux fibroblastes et de l'abondant tissu adipeux de l'organe vont, ensemble, produire un environnement inflammé, vascularisé et nécrosé qui croît sans organisation et peut produire des métastases (Balkwill et al, 2012). Cette entité toxique pour l'organisme que représente cette masse cellulaire peut également développer des résistances même aux traitements les plus agressifs comme la radiothérapie et la chimiothérapie. C'est le cas de plusieurs tumeurs TN dont les patientes ne peuvent recevoir que ces traitements (Irvin et Carey, 2008).

1.4.1 Le fibroblaste

Le fibroblaste est le type cellulaire de soutien le plus abondant du corps et présente une forte hétérogénéité à l'intérieur d'un même individu (Chang et al, 2002 ; Kalluri et Zeisberg, 2006). C'est une cellule mésenchymateuse qui occupe une place prédominante dans le tissu de soutien. Le fibroblaste est la source principale du collagène de type I, III et V et la fibronectine (Rodermann et Müller, 1991), des composants de la MEC qui soutiennent le tissu épithélial et les autres éléments du stroma, mais son rôle ne s'arrête pas là. Il contribue à la formation de la membrane basale en sécrétant du collagène type IV et de la lamine. La déposition de ces composantes s'accompagne de la sécrétion par le fibroblaste de protéines dégradant la MEC comme des métalloprotéinases matricielles (MMP) pour maintenir l'homéostasie du tissu conjonctif. Il joue également un rôle dans la régulation de la différenciation épithéliale en maintenant leur morphologie par de nombreuses interactions épithéliales-stromales, soit via la sécrétion de facteurs de croissance ou via des contacts physiques (Wiseman et Werb, 2002).

Plus important encore, le fibroblaste participe à la régulation de l'inflammation (Parsonage et al, 2005) et joue un rôle primordial dans la réparation des plaies (Tomasek et al, 2002). Le processus de réparation des plaies impliquant les myofibroblastes dans la fibrose est très similaire à la réponse desmoplastique des CAFs (*cancer-associated fibroblasts*) qui résulte de la présence des cellules cancéreuses dans la glande mammaire. Il est important de mentionner que myofibroblastes et CAFs ne sont pas des synonymes absolus. Les myofibroblastes représentent les fibroblastes activés dans une plaie. Les CAFs peuvent être des myofibroblastes, mais ce n'est pas le cas de toutes. En effet, il existe une très forte hétérogénéité (Costa et al, 2018), entre autres au niveau de leur origine. Les CAFs peuvent originer d'un fibroblaste (Rønnov-Jessen et Petersen, 1993), d'une cellule épithéliale (Cirri et Chiarugi, 2011 ; Radisky et al, 2007), endothéliale (Zeisberg et al, 2007), musculaire lisse (Cirri et Chiarugi, 2011) ou myoépithéliale (Petersen et al, 2003), d'un péricyte (Spaeth et al, 2009) ou d'un adipocyte (Bochet et al, 2013)

et plus encore (Santi et al, 2018). Puisque nous nous intéressons ici strictement aux CAFs originaires de fibroblastes, nous utiliserons les termes comme synonymes dans ce travail.

1.4.1.1 L'activation des fibroblastes

Le processus d'activation des fibroblastes dans une tumeur mammaire, bien que ce dernier ne soit pas encore entièrement bien compris, est très similaire à celui qu'on retrouve dans une fibrose. La présence des cellules cancéreuses, même séparées par la membrane basale des canaux mammaires, induit la différenciation des fibroblastes adjacents au même titre que la tension musculaire d'une entaille perturbe le tissu et stimule l'activation des fibroblastes dans l'environnement immédiat (Kalluri, 2016). En plus des stimuli environnementaux tels l'hypoxie, le stress oxydatif et la tension mécanique, les facteurs de croissance (FC) clés sécrétées par les cellules cancéreuses qui sont impliquées dans l'activation des fibroblastes en CAFs sont le TGF- β (*transforming growth factor* bêta), le facteur de croissance dérivé des plaquettes (PDGF), le facteur basique des fibroblastes (FGF) et l'interleukine 6 (IL-6) (Elenbaas et Weinberg, 2001 ; Kalluri et Zeisberg, 2006 ; Santi et al, 2018).

Le facteur le plus critique pour l'activation des fibroblastes est TGF- β , un FC impliqué dans une variété de processus biologiques comme le développement, la prolifération cellulaire, l'apoptose, la migration, la réparation des plaies, l'inflammation et l'angiogenèse (Abnaof et al, 2014 ; Blobe et al, 2000 ; Felker et al, 2010). Son expression corrèle avec l'accumulation du tissu desmoplasique (Aoyagi et al, 2004 ; Löhr et al, 2001) et la progression du cancer (Akhurst, 2002 ; Gorsch et al, 1992). En effet, TGF- β est aussi utilisé pour déterminer le stade de la tumeur, puisque les tumeurs plus avancées en expriment davantage. Mais le rôle de ce FC n'a pas toujours été clair dans la compréhension de la tumorigenèse en général, puisque le TGF- β a d'abord été décrit comme un suppresseur tumoral puisqu'il inhibe la croissance tumorale (Akhurst et Derynck, 2001 ; Coffey et al, 1988). Cette idée a longtemps été adoptée par la

communauté scientifique, jusqu'à ce que certaines études démontrent que des traitements de TGF- β sur des cellules cancéreuses augmentaient leurs capacités migratoire, invasive et métastatique *in vitro* comme *in vivo* (Arteaga et al, 1993 ; Ueki et al, 1992 ; Welch et al, 1990). Maintenant, la dualité de fonctions de TGF- β est reconnue. Il inhibe la progression tumorale dans les stades précoces de la tumorigenèse jusqu'à un certain point où la voie de signalisation inverse sa fonction pour promouvoir plutôt que de contraindre la croissance de la tumeur, et ce, sans mutations à aucun des facteurs de la voie de signalisation (Cui et al, 1996). La complexité de cette dualité est intéressante pour une meilleure compréhension des processus menant à la formation des tumeurs ou d'autres maladies, mais ce n'est pas le propos de ce projet de recherche. Ce qui nous intéresse ici, c'est que TGF- β a été démontré pour activer les fibroblastes *in vitro* (Desmoulière et al, 1993 ; Lieubeau et al, 1994 ; Negmadjanov et al, 2015 ; Rønnov-Jessen et Petersen, 1993), suggérant qu'un phénomène similaire se produit *in vivo* étant donné que le TGF- β est l'une des molécules les plus sécrétées par les cellules cancéreuses (Gold, 1999 ; Kalluri et Zeisberg, 2006).

Un autre facteur important pour l'activation des fibroblastes est PDGF, un autre sécrété par les cellules cancéreuses et est également corrélé avec la progression tumorale (Bronzert et al, 1987). Chose intéressante, la majorité des tumeurs n'expriment pas les récepteurs de cette molécule et pourtant la sécrètent, suggérant que son utilité est dirigée vers d'autres types cellulaires comme les fibroblastes (Forsberg et al, 1993). Ce facteur de croissance n'induit pas la différenciation des fibroblastes, mais promeut plutôt leur prolifération et l'angiogenèse, ce qui contribue à l'augmentation du desmoplasme de la tumeur (Shao et al, 2000).

Ensuite il y a le FGF, le facteur dit basal puisqu'il stimule la prolifération des fibroblastes, mais n'induit pas la différenciation en myofibroblastes (Rønnov-Jessen et al, 1996). Ce facteur est impliqué dans la régulation du développement et la réparation des plaies, en plus d'induire l'angiogenèse (Folkman et al, 1988 ; Katoh, 2019). Son implication dans le processus de fibrose

a été prouvée par plusieurs études, suggérant que son implication est similaire pour la desmoplasie (Kalluri et Zeisbert, 2006 ; Strutz et al, 2000).

Finalement, IL-6 est une cytokine parmi plusieurs autres produites par les cellules cancéreuses. Cette cytokine a une activité duale pro- comme anti-inflammatoire (Scheller et al, 2011) et a démontré promouvoir la résistance aux traitements de radiothérapie (Chou et al, 2009). Plus important encore, IL-6 participe à l'activation des fibroblastes (Giannoni et al, 2010).

1.4.1.2 Les CAFs, des cellules polyvalentes

Une fois activés en CAFs, ces fibroblastes présentent un phénotype différent avec des fonctions améliorées qui contribuent à la progression tumorale due à la production du desmoplasme (figure 4). C'est cette réponse desmoplasique qui joue un rôle prédominant dans la progression tumorale, particulièrement en favorisant la capacité de migration et d'invasion des cellules cancéreuses (Ishii et al, 2010). Parmi les nombreux processus biologiques dans lesquels sont impliqués les CAFs, il y a le remodelage de la MEC, la stimulation de l'inflammation et de l'infiltration lymphocytaire, en plus de la stimulation de la prolifération, la migration et la motilité d'eux-mêmes et des cellules cancéreuses en plus de l'altération du destin cellulaire via la TEM (Gascard et Tlsty, 2016 ; Tlsty et Hein, 2001 ; Yu et al, 2014).

Bien qu'il n'existe pas de marqueurs spécifiques pour identifier les myofibroblastes ou CAFs, certains marqueurs sont tout de même utilisés. Le plus important et le plus utilisé de ces marqueurs est l'actine alpha de muscle lisse (SMA- α) (Leavitt et al, 1985 ; Tomasek et al, 2002 ; Tsukada et al, 1987). Cette actine se retrouve dans les muscles lisses, comme son nom l'indique, mais est également exprimé dans les myofibroblastes et CAFs à la suite de la différenciation induite par TGF- β et FGF (Abdalla et al, 2013). La présence de cette actine dans

la cellule permet la contraction musculaire à l'intérieur de leur cytoplasme. Couplés à l'expression de sites d'adhésion focale, les filaments d'actine permettent aux myofibroblastes de joindre les deux bouts d'une blessure lors d'une plaie (Gabbiani, 2003). Bien qu'une majorité de CAFs exprime SMA- α , ce n'est pas le cas de tous. Il est donc possible d'utiliser des marqueurs de cellules mésenchymateuses tels la protéine d'activation de fibroblaste (FAP), la protéine spécifique de fibroblaste (FSP-1) et la vimentine, en plus des molécules de surface comme la protéine CD36 et la cavéoline 1 (CAV1) (Gascard et Tlsty, 2016 ; Kalluri, 2016). La plupart de ces marqueurs sont exprimés également par les fibroblastes en quiescence, mais avec une abondance moindre (figure 4).

En plus de leurs capacités contractiles acquises avec l'actine SMA- α , les CAFs augmentent à la fois leur propre prolifération, entre autres par la production de TGF- β , PDGF et FGF (Santi et al, 2018). Dû à cette fonction ainsi que celle provenant des cellules cancéreuses, les CAFs peuvent représenter jusqu'à 80 % des fibroblastes retrouvés dans une tumeur mammaire (Sappino et al, 1988). S'ajoute la production accrue d'autres FC par les CAFs comme celui de l'hépatocyte (HGF), le facteur de croissance épidermique (EGF), du tissu conjonctif (CTGF) et celui similaire à l'insuline (IGF) (Cirri et Chiarugi, 2011 ; Kalluri, 2016 ; Östman and Augsten, 2009). Ces facteurs contribuent directement ou indirectement à la croissance tumorale, la survie cellulaire et augmentent les capacités migratoires, invasives et métastatiques des cellules tumorales (Álvarez-Teijeiro et al, 2018 ; Tao et al, 2017).

Une autre façon de promouvoir les capacités migratoire et invasive des cellules tumorales passe par le remodelage de la MEC orchestré de façon majeure par les CAFs via la stimulation de TGF- β (Goc et al, 2011). La desmoplasie résultante est due à l'augmentation de leur sécrétion de collagènes, de fibronectine et de glycoprotéines telle la ténascine C (TNC) (Egeblad et al, 2010 ; Ozbek et al, 2010). Ce qui donne un environnement dense en fibres qui renferme de nombreux FCs et cytokines. Pour permettre la séquestration de ces molécules et le passage des cellules cancéreuses dans ce dense environnement, les CAFs sécrètent à fortes concentrations

des enzymes remodelant la MEC. Des protéines de liaisons des filaments comme les lysyl oxydases (LOXs) et des transglutaminases (TGMs) ainsi que des MMPs qui, quant à eux, dégradent les composants de la MEC (Murphy et Nagase, 2008). Le débalancement de ces enzymes, couplées à l'augmentation de la déposition des composants de la MEC influence directement la progression tumorale (Lu et al, 2012 ; Pickup et al, 2014).

Les changements qu'apportent les CAFs dans la MEC la rend plus épaisse, plus propice au phénotype des CAFs, augmentent l'invasion et le caractère métastatique des cellules cancéreuses et stromales, l'interaction cellules cancéreuses et endothéliales, la TEM ainsi que le recrutement des cellules immunitaires (Acerbi et al, 2015 ; Calvo et al, 2013 ; Egeblad et al, 2010 ; Reid et al, 2017 ; Santi et al, 2017 ; Zaman et al, 2006). Les CAFs vont également produire plusieurs cytokines et chimiokines afin de participer au recrutement des cellules immunitaires et ainsi contribuer à la réaction inflammatoire présente dans la tumeur (Servais et Erez, 2013). Les chimiokines comme les ligands de motif C-X-C; CXCL12 (Luker et al, 2012) et CXCL14 (Augsten et al, 2014) et le ligand de motif C-C; CCL5 (Mi et al, 2011) sont couramment exprimés par les CAFs et sont également reconnus pour être des facteurs prométastatiques. En plus des cytokines et chimiokines, les CAFs promeuvent l'inflammation en augmentant la production endogène d'espèces réactives d'oxygène (ROS) ce qui contribue à la nécrose du tissu (Mittal et al, 2014) et stimule davantage la prolifération, migration et invasion des cellules cancéreuses (Li et al, 2014).

Les CAFs participent également à l'angiogenèse *in situ* de la tumeur ce qui permet de produire de nouveaux vaisseaux sanguins afin d'apporter des nutriments et éliminer les déchets cellulaires pour permettre à la masse cellulaire de survivre et de s'étendre. Le facteur le plus important est le FC vasculaire endothélial (VEGF), une cytokine polyvalente pour l'angiogenèse et la lymphangiogenèse (Carmeliet, 2005 ; Shibuya et Claesson-Welsh, 2006). D'ailleurs, les CAFs sont la source principale de VEGF, bien que les cellules cancéreuses et endothéliales en produisent également (Gomes et al, 2013 ; Lee et al, 2018 ; Zhang et Liu, 2013). La cytokine IL-

6 qui, comme nous l'avons déjà vu, permet l'activation des fibroblastes est aussi un facteur angiogénique important produit par les CAFs (Nagasaki et al, 2014).

Finalement, lorsque la masse cellulaire devient invasive, traverse la membrane basale et envahit le stroma réactif, les CAFs vont se retrouver au front de migration (Elenbaas et Weinberg, 2001 ; Gaggioli et al, 2007). Ce qui démontre l'importance de leurs activités, et ce même aux stades plus tardifs de la tumorigenèse.

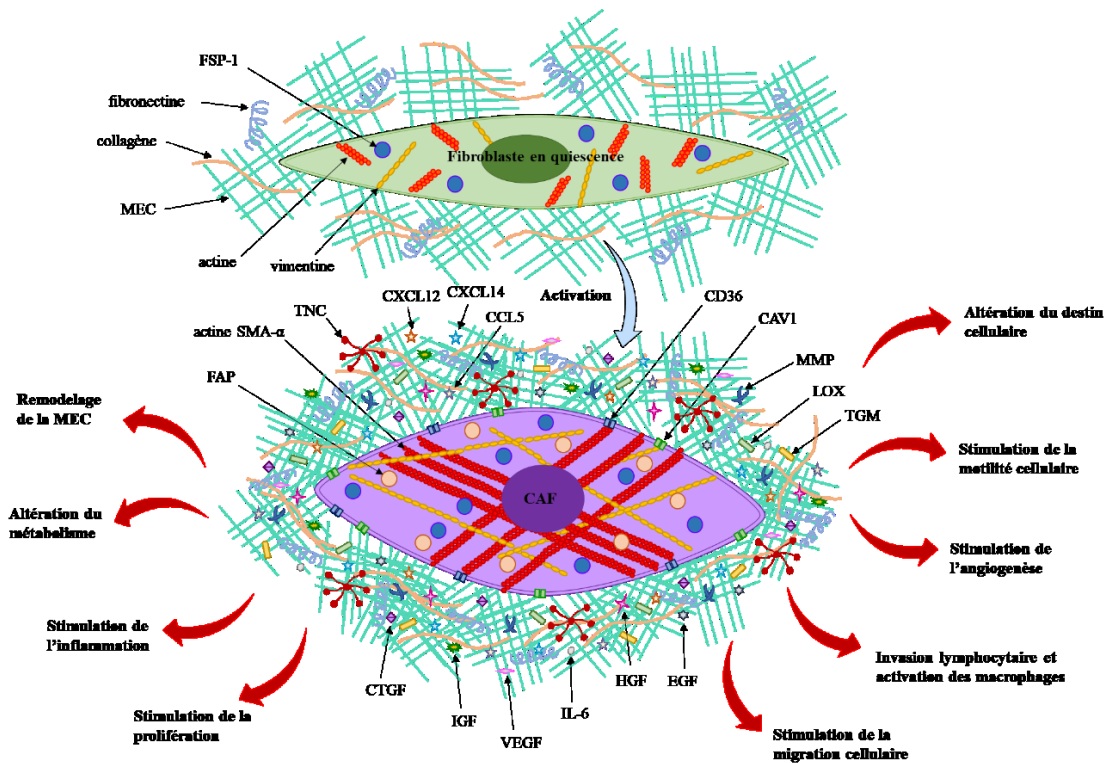


Figure 4 : Résumé des caractéristiques du CAF.

Schématisation des caractéristiques du myofibroblastes. Inspiré et adapté de Gascard et Tlsty (2016) et de Kalluri et Zeisberg (2006). CAF, *cancer-associated fibroblast*; MEC, matrice extracellulaire; FSP-1, protéine spécifique de fibroblaste 1; SMA- α , alpha de muscle lisse; TNC, ténascine C; FAP, protéine d'activation de fibroblaste; CXCL2, CXCL14 et CCL5, chimiokines; CAV1, cavéoline 1; MMP, métalloprotéinase matricielle; LOX, lysyl oxydase; TGM, transglutaminase; CTGF, facteur de croissance du tissu conjonctif; IGF, facteur de croissance similaire à l'insuline; HGF, facteur de croissance de l'hépatocyte; EGF, facteur de croissance épidermique; VEGF, facteur de croissance vasculaire endothéliale; IL-6, interleukin-6.

1.5 But du projet et hypothèses

À la lumière de ce qui est retrouvé dans la littérature, LRH-1 joue un rôle important dans la tumorigenèse mammaire, particulièrement dans les modèles TN. Nous avons donc, dans le cadre de ce projet, exploré ce rôle dans la prolifération et la migration cellulaire. Pour ce faire, des ARN interférents ont servi pour réduire l'expression du récepteur dans la lignée cancéreuse murine TN D2A1 et celle humaine TN MDA-MB-231 dans des essais *in vitro* afin de comparer la réponse à la déplétion chez les deux espèces. Nous avons également exploré l'effet du microenvironnement, soit le sécrétome des fibroblastes NIH/3T3, sur les cellules déplétées pour LRH-1. Avant cela, nous verrons l'effet d'une drogue pharmacologique visant LRH-1 sur les lignées murines MC7-L1, D2A1 et 4T1 comme autre moyen de réduire l'expression de LRH-1.

À partir des connaissances actuelles sur LRH-1, nous nous attendons à voir une diminution des capacités de prolifération et de migration lorsque la protéine est réduite. Nous nous attendons également à voir une réduction de la transcription de gènes impliqués dans ces processus moléculaires avec la déplétion ou le blocage pharmacologique de LRH-1. De plus, nous nous attendons à voir les effets bénéfiques du sécrétome des NIH/3T3 sur ces mêmes phénotypes et, s'il y a un lien entre l'un des composants du sécrétome et LRH-1, nous pourrions observer une diminution de leurs effets sur la prolifération et la migration lorsque LRH-1 sera déplété.

CHAPITRE 2

MATÉRIEL ET MÉTHODES

2.1 Lignées cellulaires et conditions de culture

Le laboratoire du Pr Benoît Paquette (Ph. D.) de la Faculté de médecine et de sciences de l'Université de Sherbrooke (UdeS) nous a fourni quatre lignées qui ont été initialement achetées à la compagnie *American Type Culture Collection* (ATCC), c'est-à-dire les lignées murines MC7-L1, D2A1, 4T1 et NIH/3T3. La lignée humaine MDA-MB-231 est depuis longtemps utilisée dans notre laboratoire. Son origine n'a pas pu être retracée, il est toutefois fort possible qu'elle ait été initialement achetée également de la compagnie ATCC. La lignée 293T, utilisée pour la production de virus, a été achetée initialement de la compagnie ATCC et entretenue selon les directives de la compagnie par la technicienne de laboratoire de la salle de culture, Manon Dufresne. Nous mentionnerons donc cette dernière lignée uniquement lorsque nous aborderons la production du virus pour les ARN interférents.

Toutes les lignées ont été cultivées dans des pétris de polystyrène dans un environnement contrôlé à 37 °C et 5 % de CO₂. Le milieu de culture utilisé était le DMEM (*Dulbecco Modified Eagle Medium*) supplémenté de glutamine à 2 mM, de sodium pyruvate à 1 mM, ainsi que d'antibiotiques, soit de la pénicilline à 100 unités/mL et de la streptomycine à 100 µM, et, finalement, du sérum FBS (*Fetal Bovine Serum*) à 10 %. Les passages cellulaires se font aux trois ou quatre jours avec des dilutions de 1/20 pour les lignées MC7-L1, D2A1, 4T1 et NIH3T3 ou 1/5 pour la lignée MDA-MB-231 dans un nouveau milieu DMEM à la suite de l'usage d'une solution de trypsine pour décoller sans endommager les cellules. Les lavages précédents la trypsine ont été faits avec une solution saline de phosphate (PBS). La congélation des cellules

s'est faite dans du milieu DMEM supplémenté de 5 % de diméthylsulfoxyde (DMSO) dans les premiers trois à cinq passages. Les cellules ont été utilisées jusqu'à un maximum de quinze passages. Toutes les lignées ont été testées pour les mycoplasmes après chaque décongélation.

Pour les expériences, les cellules ont été comptées grâce au compteur de cellules automatique de *Bio-Rad* (TC20). La procédure pour le comptage consistait au mélange d'une portion de la suspension de cellules à du bleu de trypan mis sur une lamelle et analysé par l'appareil. Le nombre de cellules vivantes était pris en compte pour calculer le volume de cellules requis.

Dans ce projet, nous nous intéressons particulièrement au profil tumoral TN, c'est pourquoi le profil des cellules utilisées est important comme information. Mais il ne suffit pas de connaître leur profil clinique ou moléculaire, mais l'historique des lignées est pertinent pour mieux comprendre leurs différences et envisager leurs comportements aux traitements. Dans le reste de cette section, nous aborderons l'historique, le profil – sauf pour la lignée NIH/3T3 – ainsi que la morphologie et le comportement des différentes lignées de cellules utilisées dans ce projet.

2.1.1 MC7-L1

La cellule MC7-L1 est une cellule cancéreuse présentant une forme fusiforme et ayant une faible confluence au bout de quatre jours pour une même quantité de cellules initiales. Cette lignée résulte de l'induction d'un carcinome mammaire chez une souris BALB/c grâce à de l'acétate de médroxyprogestérone (MPA) (Lanari et al, 1986) qui a été, par la suite, cultivée *in vitro* en absence de MPA (Kordon et al, 1994) pour finalement être stabilisée par plusieurs passages syngéniques *in vivo* puis isolée selon le temps d'adhérence *in vitro* (Lanari et al, 2001) (annexe

A, figure 25). Ainsi, la lignée MC7-L1 exprime ER et PR, mais ne répond qu'aux œstrogènes. C'est le seul modèle œstrogène-dépendant de ce projet.

2.1.2 D2A1

La cellule D2A1 présente plutôt une forme épithéliale avec une très forte confluence après quatre jours, montrant une croissance verticale également. Cette lignée cellulaire provient d'une dilution clonale à la suite de passages syngéniques *in vivo* d'un nodule hyperplasique préneoplasique apparu spontanément dans une souris BALB/c (Medina, 1973) (annexe A, figure 26). D2A1 est une lignée TN (Bouchard et al, 2016).

2.1.3 4T1

La lignée 4T1 est TN également, mais diverge grandement de la lignée D2A1 précédemment décrite. Les cellules présentent une physiologie très diversifiée de forme épithéliale comme fusiforme, elles ont tendance à pousser en colonie et à la verticale avant de combler les espaces vides à l'horizontale. L'historique de la lignée est complexe (annexe A, figure 27). Tout commence avec l'apparition spontanée d'une tumeur mammaire chez une souris BALB/cfC3H, une souris qui a donc été injectée avec un virus facilitateur de cancer (Dexter et al, 1978). Après plusieurs passages *in vitro* et *in vivo*, les cellules ont provoqué, à leur dixième passage *in vivo*, l'apparition spontanée d'un nodule sphérique dans l'un des lobes du poumon d'une souris qui fut retiré et mis en culture, donnant naissance à la lignée 4.10LM (Heppner et al, 1978). Après plusieurs passages *in vitro*, quelques passages *in vivo* et le maintien de la lignée *in vitro* encore par la suite, la lignée fut désignée 410.4 (Miller et al, 1983). Finalement, par des traitements à la thioguanine, un composé chimique couramment utilisé en chimiothérapie, une lignée

cellulaire a été sélectionnée pour sa résistance, c'est-à-dire la lignée 4T1 (Aslakson et Miller, 1992).

2.1.4 MDA-MB-231

La cellule MDA-MB-231 présente une forme fusiforme et une confluence après quatre jours très similaires à la lignée MC7-L1. Cette lignée humaine a été obtenue de dilutions clonales à partir d'un échantillon d'épanchement pleural d'une patiente qui avait subi une mastectomie quelques mois auparavant à la suite de l'apparition d'une masse. L'échantillon a été récolté suites à trois semaines de traitement de chimiothérapie qui n'a donné aucun résultat positif pour la guérison de la patiente (Cailleau et al, 1974) (annexe A, figure 28). Cette lignée a aussi été confirmée comme étant une TN (Neve et al, 2006), un modèle très utilisé par plusieurs laboratoires dans le monde.

2.1.5 NIH/3T3

La cellule NIH/3T3 est un fibroblaste de forme fusiforme dont certaines cellules dans la population présentent un cytoplasme très étendu. Ces fibroblastes ont une inhibition de contact, les passages se sont donc faits de façon à ne pas dépasser 80 % de confluence après quatre jours. Cette lignée provient de la récolte de fibroblastes embryonnaires murins immortalisés (Aaronson et Todaro, 1968) (annexe A, figure 29).

2.2 ARN interférents

Afin de déterminer l'implication de LRH-1 dans les phénotypes étudiés, les lignées cancéreuses D2A1 et MDA-MB-231 ont été déplétées à l'aide de petits ARN interférents en épingle à cheveux (*short hairpin*) (ARNsh). Les deux meilleurs ARNsh ont été sélectionnés pour chaque type cellulaire. D'abord, les ARNsh ont été sélectionnés pour D2A1 grâce à diverses infections effectuées et des tests de titrage, tandis que ceux pour MDA-MB-231 ont déjà été identifiés par Stéphanie Bianco (Ph. D.) dans notre laboratoire. Les plasmides utilisés sont présentés dans le tableau 1 et la figure 30 de l'annexe B. La transduction des ARNsh s'est faite à l'aide de lentivirus produits au préalable dans des cellules 293T.

Pour évaluer l'efficacité des ARNsh pour la déplétion de LRH-1, l'abondance de l'ARNm de LRH-1 a été quantifiée par RT-qPCR et l'abondance protéique de LRH-1 par immunobuvardage a été tentée. Deux réplicats biologiques ont été nécessaires pour identifier les meilleurs ARNsh murins (annexe D). Pour chaque réplicat subséquent, autant pour les cellules humaines que murines, l'abondance des ARNm de LRH-1 a été testée jusqu'à 8 fois pour D2A1 et 5 fois pour MDA-MB-231.

2.2.1 Préparations des plasmides

Tous les plasmides des ARNsh utilisés ont été construits à partir du vecteur pLKO qui a servi de contrôle dans les deux lignées (annexe B, figure 31). Le plasmide pLVTHM (annexe B, figure 32) a été utilisé pour l'évaluation de l'efficacité de la transfection puis de la transduction grâce à la quantification visuelle de la protéine GFP exprimée par les cellules. Finalement, les plasmides pPAX2 et pMD2G (annexe B, figures 33,34) ont été incorporés avec le vecteur

d'intérêt, soit les ARNsh, pLKO ou pLVTHM, afin de pouvoir produire les protéines nécessaires à la capsule virale.

Les plasmides ont été amplifiés dans des bactéries compétentes puis purifiés avec les solutions du Maxi kit pour plasmides de la compagnie *Qiagen* (No. 12163) selon les instructions du manufacturier. Afin de vérifier la pureté des plasmides résultant de l'isolation, une digestion enzymatique s'est faite en utilisant les enzymes pertinentes selon le plasmide (annexe B, voir flèches grises et noires des figures 31 à 34). Les plasmides digérés ont été placés dans un gel d'agarose 1 % avec, en contrôle, des plasmides non digérés (annexe B, figure 35).

2.2.2 Préparation des virus

La veille de la transfection, cinq millions de cellules 293T ont été ensemencées pour ainsi atteindre une confluence de 100 % au jour un (J1). La transfection s'est faite à l'aide d'un agent de transfection ; le polyéthylénimine (PEI) dans du milieu DMEM sans aucun supplément. Après cinq minutes d'incubation à la température ambiante (T°A), les vecteurs d'intérêt ont été ajoutés, soit les constructions de LRH-1, pLKO et pLVTHM, ainsi que les vecteurs pPAX2 et pMD2G pour quinze minutes d'incubation à la T°A. Le mélange a été dispersé dans les pétris de façon le plus homogène possible. Les 293T ont été incubés à 37 °C pour deux jours avant que le virus produit soit récolté et congelé immédiatement à -80 °C jusqu'à son utilisation.

2.2.3 Infection des cellules cancéreuses

La transduction des cellules cancéreuses s'est faite en suspension avec un volume minimal de virus, soit de 3,5 mL de DMEM + FBS et 3,5 mL de virus au jour zéro (J0). Le milieu a été changé le lendemain (J1) avec le volume habituel de 10 mL de DMEM + FBS supplémenté de

2 µg/mL de puromycine. Les cellules ont été récoltées au J4 pour effectuer les divers essais (voir figure 5).

2.3 ML180 : agoniste inverse de LRH-1

Le ML180, un agoniste inverse de LRH-1 (Busby et al, 2010), acheté de la compagnie *Cayman Chemical* (No. 15181), a été utilisé sur les trois lignées cancéreuses murines MC7-L1, D2A1 et 4T1. Les concentrations utilisées sont de 1, 2.5 et 5 µM diluées dans du DMSO à 100 % qui, seul, a servi de contrôle. Les cellules ont été traitées durant 24 h avant d'être récoltées pour effectuer une RT-qPCR ou un immunobuvardage, ou bien pour les tests de migration.

2.4 Milieux conditionnés

Quatre types de milieux ont servi dans le cadre de ce projet. Le premier milieu, annoté FBS+, consiste en du DMEM supplémenté tel que décrit dans le point 1 comprenant, entre autres, du FBS. Ce milieu a servi de contrôle positif puisque les cellules peuvent facilement y proliférer. Le deuxième, annoté FBS-, est un milieu DMEM supplémenté uniquement d'antibiotiques pour éviter la prolifération d'agents contaminants et a servi de contrôle négatif puisqu'il n'y a donc aucun nutriment pour les cellules pour proliférer. Le troisième milieu, annoté Fibros, correspond au sécrétome des fibroblastes NIH/3T3 décrits dans le paragraphe suivant. Finalement, le dernier milieu, annoté ½ Fibros, consiste au milieu Fibros dilué deux fois dans du milieu FBS-.

Le milieu Fibros consiste au sécrétome des fibroblastes NIH/3T3 en condition de sevrage. Les fibroblastes NIH/3T3 ont été ensemencés et laissés en culture durant 48 h, jusqu'à l'obtention d'une confluence d'environ 70-80 %. Les cellules ont été d'abord rincées à l'aide de PBS avant

d'être mis en contact avec du milieu FBS- afin de les sevrer. Les fibroblastes sont restés dans ce milieu pauvre durant 24 h avant que ce dernier soit récolté, filtré et congelé à -80 °C pour une conservation à long terme, ou conservé au frais à 4 °C pour une utilisation immédiate ou dans les jours subséquents.

2.5 Quantification de l'ARNm

2.5.1 Extraction d'ARNm

L'extraction de l'ARN des cellules a été effectuée avec le kit d'extraction de *Bio Basic (EZ-10 RNA Mini-Preps Kits*, CAT : BS88583) en suivant les consignes du fabricant. L'ARN résultant de l'extraction a été quantifié par le spectromètre *Nanodrop* et leur qualité testée sur des gels d'agarose à 1 %.

2.5.2 RT-qPCR

La rétrotranscription (RT) en ADNc s'est faite en suivant un protocole du laboratoire. D'abord, 300 ng d'ARN ont été mélangés dans de l'eau stérile avec des hexamères aléatoires à une concentration de 0,5 µg/µL. Un chauffage de cinq minutes à 70 °C a permis l'amorçage aléatoire avant l'ajout de l'enzyme transcriptase inverse MMLV (*Moloney Murine Leukemia Virus*) et son tampon, ainsi que 10 mM de nucléotides triphosphates (dNTP). La MMLV chauffée à 37 °C permet de transcrire les ARN en ADN complémentaire (ADNc). Finalement, la dénaturation de la réaction s'est faite en quinze minutes à 70 °C. Le détail des quantités utilisées des composants énoncés sont retrouvés dans le tableau 2 (annexe C). L'ADNc obtenu a été soit dilué huit fois accompagné d'une échelle de standard de dilutions de 1/5, 1/25 et 1/125 pour les réplicats

biologiques des essais avec la drogue ML180 ou a été dilué quatre fois accompagné d'une échelle de standard de dilutions de 1/4, 1/16 et 1/32 pour les essais avec les ARNsh.

La réaction de polymérisation en chaîne quantitative (qPCR) a été effectuée dans l'appareil *CFX* de *Bio-Rad*. L'ADNc a été ajouté à un mélange à qPCR préparé dans notre laboratoire. Ce mélange comprend de l'eau stérile, du tampon de qPCR, des nucléotides dNTP à 10 mM, du DMSO à 50 %, la *taq* et du *Sybr* (détails dans le tableau 3, annexe C). Les cycles d'amplification consistent en un premier cycle de trois minutes à 95 °C puis quarante cycles de dix secondes à 95 °C suivis de trente secondes à 60 °C avant la lecture. Les différentes amorces utilisées sont listées pour l'humain (annexe C, tableau 4) et pour la souris (annexe C, tableau 5). Les analyses se sont fait grâce au programme *CFX Manager 3.1*, où l'expression des gènes a été évaluée selon les gènes contrôles *RPLP0*, *RPS28* et *HPRT* pour les cellules humaines et les gènes contrôles *Rplp0*, *Rps18*, *Actb* et *Gusb* pour les cellules murines.

2.6 Immunobuvardage

L'extraction protéique nucléaire s'est effectuée selon un protocole instauré dans notre laboratoire. Les cellules ont d'abord été récoltées en les rinçant au PBS et les décollant physiquement avant d'être congelées dans de l'azote liquide puis conservées à -80 °C. Le jour de l'extraction, les cellules ont été doucement décongelées sur glace. Les culots cellulaires ont été suspendus dans la première solution A contenant de l'acide HEPES (4-(2-hydroxyéthyl)-1-piperazineéthanesulfonique) à un pH de 7,9, du chlorure de potassium (KCl), de l'EDTA (acide éthylenediaminetetraacétique) et de l'EGTA (acide aminopolycarboxylique) dans lequel a été ajouté du dithiothréitol (DTT), du PMSF (fluorure de phénylméthylsulfonyl) et un cocktail d'inhibiteurs de phosphatase (IP). Le mélange est resté sur glace durant une heure avant d'ajouter du détergent NP40 à 10 % puis être centrifugé, permettant de briser les membranes cytoplasmiques. Le contenu cytoplasmique mis de côté, la solution B a été ajoutée au culot de

noyaux. Cette solution contient également de l'acide HEPES, de l'EDTA, de l'EGTA, mais du chlorure de sodium (NaCl), au lieu du KCl, dans lequel a été ajouté également du DTT, du PMSF et du cocktail IP. Le mélange a été placé sur un agitateur durant une autre heure au froid (4 °C) avant d'être centrifugé permettant de briser les membranes nucléaires pour finalement récolter le contenu protéique. Le détail sur les quantités utilisées des différentes composantes mentionnées sont retrouvés au tableau 6 (annexe C).

Les protéines ont été quantifiées au *Bradford* avant d'être ajustées à une concentration de 1 ou 2 µg/µL dans un tampon dénaturant de Laemmli contenant du SDS (Dodécyl sulfate de sodium) à 20 %, du bleu de bromophénol à 0,1 %, du glycérol, du Tris (trisasminométhane) 0,5 M à un pH de 6,8, du β-mercaptoéthanol et de l'eau stérile. Une quantité de 60 µg de protéines a été introduite dans les puits d'un gel d'électrophorèse à 10 %. Elles ont migré environ 1 h 30 à 130 volts (V) ou jusqu'à ce que le front de migration soit sorti du gel dans un tampon de migration contenant du Tris base, de la glycine, du SDS et de l'eau. Le transfert du gel s'est fait sur une membrane de nitrocellulose durant exactement une heure à 80 V dans un tampon de transfert contenant du Tris, de la glycine, de l'eau et de l'éthanol à 10 %.

Après trente minutes ou plus de blocage de la membrane de nitrocellulose dans du lait 5 %, les membranes ont été incubées avec l'anticorps (Ac) primaire contre la protéine d'intérêt durant toute la nuit à 4 °C. L'Ac visant LRH-1 était de la compagnie *Perseus Proteomics* (Cat #PP-H2325) produit de la souris, alors que l'Ac de l'histone désacétylase 2 (HDAC2) provient de la compagnie *SantaCruz* (C-19, SC-6296-1) produit du lapin, et l'Ac de la protéine à boîte TATA (TBP) provient de la compagnie *Abgent* (AP6680c) produit également du lapin. Ensuite, elles ont été incubées avec l'Ac secondaire spécifique contre l'Ac primaire, soit anti-souris ou anti-lapin, durant une heure à la T°A. Les Ac étaient dilués dans du lait 5 % soit à 1/1000 pour les Ac primaires de LRH-1, HDAC2 et 1/2000 pour l'Ac primaire TBP et 1/10 000 pour les Ac secondaires.

Un substrat de détection de la chimiluminescence (*Western Lightning Plus-ECL*), acheté de la compagnie *Perkin Elmer* (NEL103E001EA) a été ajouté aux membranes avant de les exposer sur des films de rayon X en chambre noire ou à l'aide du système *ChemiDoc XRS+* à des temps différents selon l'Ac utilisé. Les membranes contenant LRH-1 ont été exposées une heure alors que celles contenant HDAC2 ou TBP n'ont été exposées que de dix à trente minutes selon les essais. D'abord, l'expression de LRH-1 et son contrôle HDAC2 étaient testés sur deux membranes différentes, mais produites en même temps. Par la suite, la stratégie a été modifiée pour plutôt exposer de nouveau la membrane à l'Ac contrôle TBP à la suite de celle de LRH-1.

2.7 Essais *in vitro*

Les phénotypes étudiés *in vitro* dans le cadre de ce projet ont été la prolifération et la migration cellulaire. Pour chacune des méthodes, trois réplicats biologiques (N) ont été effectués et chacun de ces essais comportait trois réplicats techniques (n). La séquence sur le temps des réplicats infectés par les lentivirus est représentée sur la figure 5. Il est toutefois à noter que seuls les tests de migration ont été effectués également avec la drogue ML180 pour un seul réplicat biologique et suivant un protocole différent. Ces particularités seront discutées le cas échéant.

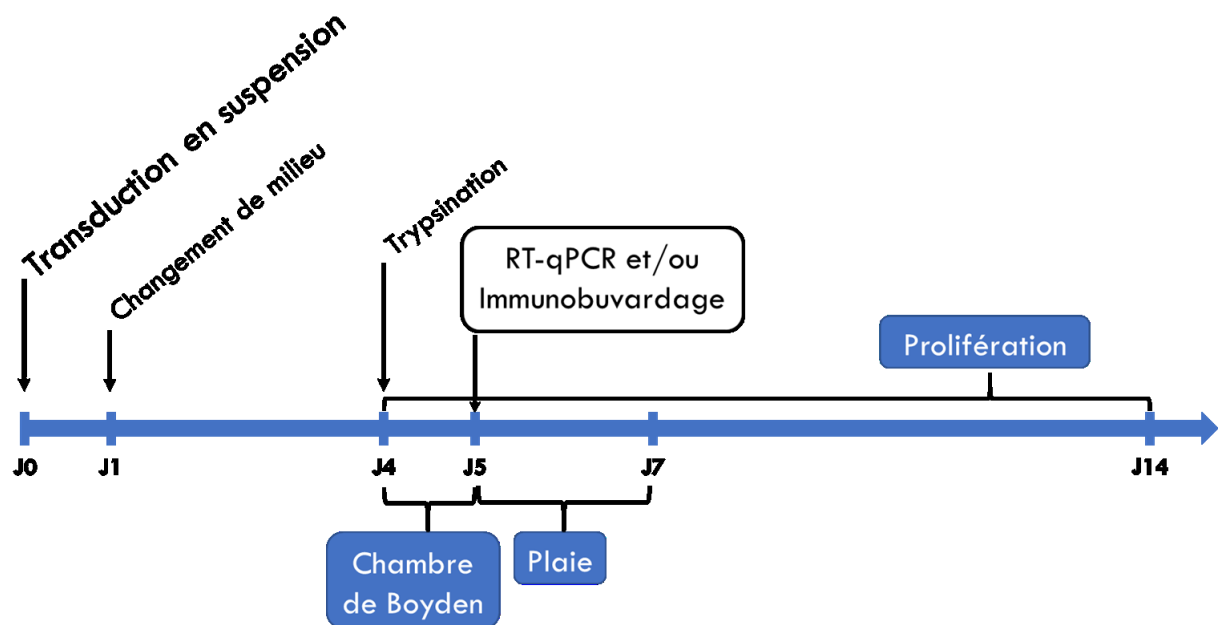


Figure 5 : Schématisation des étapes du plan expérimental utilisé pour mesurer l'impact de la déplétion de LRH-1 sur les cellules.

2.7.1 Essais de prolifération

D'abord, la prolifération cellulaire a été testée uniquement pour les essais effectués avec le milieu conditionné de fibroblastes et les ARNsh sur les lignées cellulaires MDA-MB-231 et D2A1. Elle a été suivie sur dix jours (J4 à J14) à la suite de l'infection des cellules avec le lentivirus (J4 à 14 sur la figure 5). La confluence des cellules a été mesurée et analysée à l'aide du programme de l'appareil *Incucyte S3*. Pour chaque condition, trois réplicats techniques ont servi puis cette expérience a été répétée à trois reprises.

Les cellules infectées quatre jours auparavant ont étéensemencées dans des plaques de 96 puits pour des quantités de 1 000 cellules pour la lignée D2A1 et 4 000 cellules pour MDA-MB-231.

On a laissé les cellules adhérer dans le fond du puits entre une et trois heures avant de changer les milieux pour ceux conditionnés tels que décrits au point 2.4, donc FBS+, FBS-, Fibros et ½ Fibros.

2.7.2 Essais de migration

La migration a été évaluée de deux façons, soit par une migration à travers la ou une migration par chimioattraction en chambres de Boyden. La première permet d'évaluer le temps pour les cellules de recouvrir une plaie effectuée à travers un tapis dense de cellule. En raison de la complexité de la méthode et du comportement des lignées cellulaires de ce projet, seule la lignée D2A1 a été testée avec succès par cette méthode pour les essais avec les ARNsh et le milieu conditionné de fibroblastes.

100 000 cellules ont étéensemencées dans des puits de 96 puits et laissées en culture 24h à la suite de l'infection des cellules. Le lendemain, le milieu a été changé pour les mêmes quatre conditions décrites précédemment, soit FBS+, FBS-, Fibros et ½ Fibros. Après six heures de prétraitement, la plaie a été effectuée grâce au *Wound Maker* fourni avec l'*Incucyte S3*, permettant de faire une plaie de façon simultanée dans les 96 puits. Le milieu a ensuite été changé de nouveau afin de retirer les cellules qui se sont retrouvées en suspension. La plaque a été introduite dans l'appareil *Incucyte S3* durant 48 h (J5 à J7 sur la figure 5) où le pourcentage de recouvrement de la plaie a été mesuré.

Pour les essais avec la drogue ML180, un seul réplicat biologique a été effectué avec les trois lignées murines MC7-L1, D2A1 et 4T1 avec 100 000 cellules dans des plaques de 96 puits avec du milieu FBS+ durant 24 h. Le lendemain, le milieu a été changé pour un supplémenté de la drogue ML180 à des doses de 1, 2,5 et 5 µM ou le contrôle DMSO et les cellules sont demeurées

ainsi un autre 24 h avant d'effectuer la plaie et les étapes subséquentes de la même façon que décrit précédemment.

Pour la deuxième méthode, les chambres de Boyden permettent une façon différente de tester la migration des cellules. Contrairement à l'essai de migration à travers la plaie, au lieu que les cellules baignent directement avec les éléments du milieu qui peuvent contribuer à leur motilité, les cellules sont plutôt stimulées par chimioattraction à rejoindre le milieu avantageux. Trois réplicats biologiques ont été effectués pour les lignées D2A1 et MDA-MB-231 comprenant chacun deux réplicats techniques par conditions.

Les cellules sont doncensemencées dans une condition de sevrage, donc avec du milieu FBS-, dans une chambre supérieure possédant des pores de 8 µm de diamètre. La chambre inférieure contenait les différents milieux soit FBS+, FBS-, Fibros ou ½ Fibros. Les cellules ont migré pendant 48 heures (J4 à J5 sur la figure) avant d'être fixées au paraformaldéhyde puis colorées au *Hoestch 33342* (H3570), provenant de *Molecular Probes*, qui permet de visualiser le noyau des cellules. Dix photos par puits ont été prises sous le microscope à fluorescence *ZEISS* puis les noyaux ont été comptés de façon automatique grâce au programme *CellProfiler 3.0* (Lamprech et al, 2007) avec l'aide de Daniel Garneau (M. Sc.).

2.8 Graphiques et statistiques

Les graphiques et statistiques ont été effectués grâce au programme *GraphPad*. Une analyse ANOVA a été utilisée pour déterminer si les résultats étaient significatifs. Dans le cadre de ce projet, nous considérons un résultat significatif pour une valeur $P < 0,05$.

CHAPITRE 3

RÉSULTATS

3.1 Blocage pharmacologique de LRH-1

Afin d'étudier l'impact d'un blocage pharmacologique de LRH-1 sur les phénotypes oncogéniques des cellules cancéreuses mammaires, les lignées murines MC7-L1, D2A1 et 4T1 furent traitées avec la drogue ML180. Le ML180 est une molécule agoniste inverse à LRH-1 (Busby et al, 2010), signifiant qu'elle lie le RN, mais provoque son inhibition plutôt que son activation au contraire d'un agoniste. Un agoniste inverse permet l'inhibition de l'activité spontanée d'un récepteur alors qu'un antagoniste réduit son activité induite par un ligand (Bouvier, 1994). Cette drogue a déjà été utilisée dans notre laboratoire, montrant une diminution de la protéine en immunobuvardage et une translocation potentielle du noyau vers le cytoplasme vu en immunohistochimie (Bianco, résultats non publiés). Dans le cadre de mon projet, trois concentrations ont été utilisées soit 1, 2,5 et 5 μ M en plus du contrôle dans du DMSO.

3.1.1 Abondance de l'ARNm de LRH-1 lors de traitements avec le ML180

Pour mesurer l'effet du ML180 sur nos cellules, nous avons d'abord regardé l'abondance des ARNm de LRH-1 à la suite de 24 h de traitement. Comme présenté dans la figure 6, que ce soit pour la lignée MC7-L1 (figure 6A), D2A1 (figure 6B) ou 4T1 (figure 6C), l'abondance relative de l'ARNm de LRH-1 ne change pas de façon significative avec l'augmentation de la concentration de ML180.

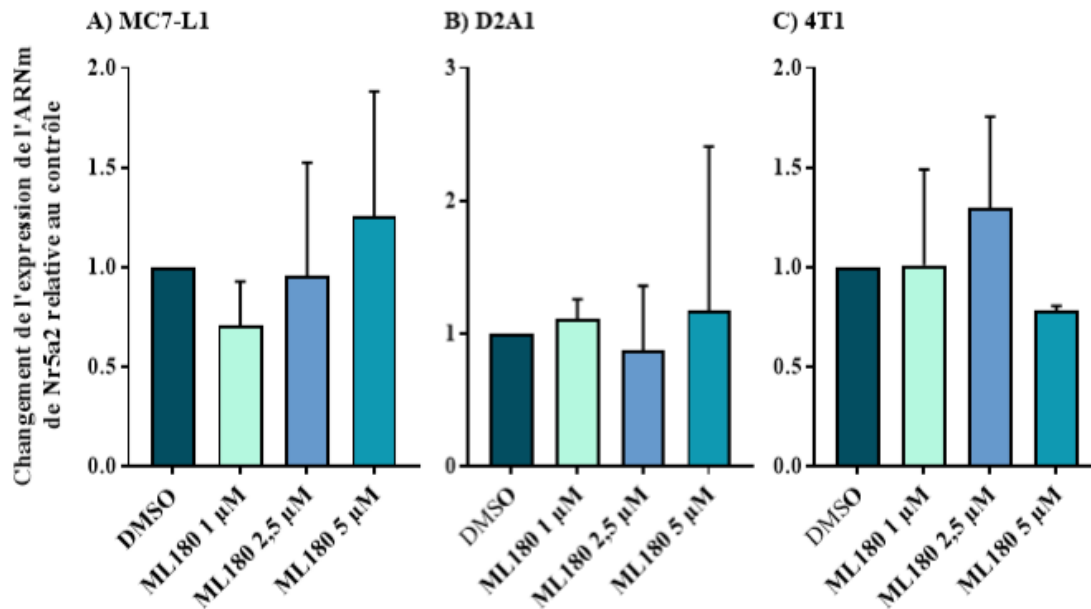


Figure 6 : Abondance relative de l'ARNm de LRH-1 lors de traitements au ML180.

Mesure de l'expression des ARNm de *Nr5a2* dans les cellules traitées à différentes concentrations de ML180 (1, 2,5 et 5 μM) ou au DMSO (contrôle) pour les lignées (A) MC7-L1, (B) D2A1 et (C) 4T1. N=3, ANOVA.

3.1.2 Abondance protéique de LRH-1 lors de traitements avec le ML180

Toutefois, lorsque traitées avec 5 μM de ML180, les cellules illustrent une diminution évidente de certaines isoformes potentielles de la protéine de LRH-1 en immunobuvardage (figure 7). D'abord, deux isoformes légèrement plus petites que 76 kilodaltons (kDa), ainsi qu'une isoforme un peu plus grosse que 52 kDa voient leur abondance diminuée pour les lignées MC7-L1 et D2A1, lorsque traitées avec le ML180. Quant à la lignée cellulaire 4T1, elle ne semble pas exprimer les deux isoformes de 76 kDa les plus abondantes de ses consœurs, mais celle de 52 kDa semble plus abondante après le traitement. De plus, on peut observer des isoformes plus petites en faible quantité qui ne changent pas selon le traitement. Le contrôle HDAC2 est stable

pour chaque échantillon. Il est à noter que ces résultats proviennent de deux membranes qui ont été produites en même temps.

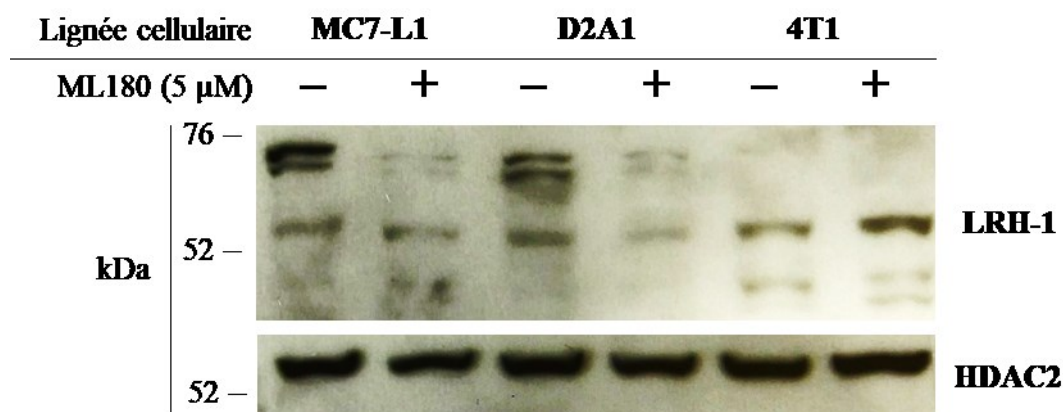


Figure 7 : Immunobuvardage de LRH-1 lors de traitements au ML180.

Immunobuvardage contre LRH-1 et le contrôle HDAC2 pour les lignées cellulaires MC7-L1, D2A1 et 4T1 traitées (+) ou non-traitées (-) avec 5 μ M de ML180. Échelle en kilodaltons (kDa).

3.1.3 Abondance des ARNm de certains gènes cibles connus ou potentiels de LRH-1 lors de traitements avec le ML180

Bien que l'ARNm de LRH-1 ne montre aucun changement significatif (figure 6), l'ARNm de ses gènes cibles connus, soit la cycline D1 (*Ccnd1*) et p21 ou *Cyclin dependent kinase Inhibitor 1A* (*Cdkn1a*), montrent des changements significatifs (figure 8). D'abord pour la lignée MC7-L1 (figure 8A), on peut observer une diminution significative de *Ccnd1* pour toutes les concentrations de ML180 ($p < 0,01$) ainsi qu'une augmentation de *Cdkn1a* pour les concentrations de 1 et 2,5 μ M de ML180 ($p < 0,001$), mais pas pour celle de 5 μ M. Ensuite, pour la lignée D2A1 (figure 8B), on peut observer une diminution de *Ccnd1* à une concentration de 2,5 μ M de ML180 ($p < 0,05$), alors qu'aucun changement significatif n'est observé pour les

deux autres concentrations, tandis qu'une augmentation significative graduelle de *Ccnd1* est observée dès la concentration de 1 μ M ($p < 0,01$) et pour les deux suivantes ($p < 0,001$). Finalement, pour la lignée 4T1 (figure 8C), aucun changement n'est observé pour *Ccnd1* alors qu'une augmentation pour *Cdkn1a* est visible à 2,5 et 5 μ M ($p < 0,001$), mais aucun changement pour la concentration de 1 μ M.

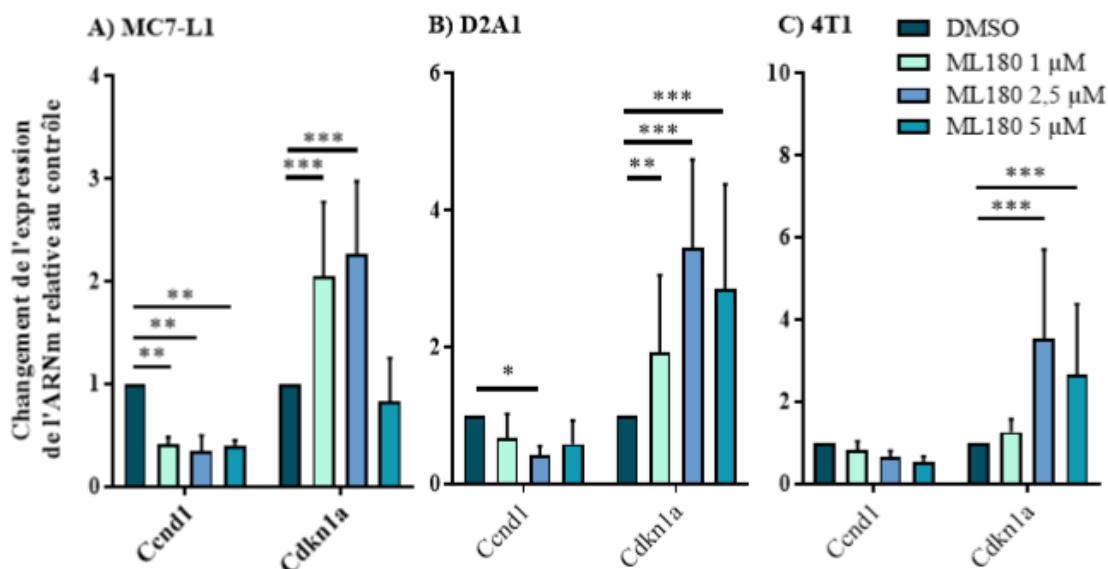


Figure 8 : Abondance relative de l'ARNm des gènes cibles connus de LRH-1 lors de traitements au ML180.

Mesure de l'expression des ARNm de *Ccnd1* et *Cdkn1a* dans les cellules traitées à différentes concentrations de ML180 (1, 2,5 et 5 μ M) ou au DMSO (contrôle) pour les lignées (A) MC7-L1, (B) D2A1 et (C) 4T1. N=3, ANOVA, p-value $< 0,05$ (*), 0,01 (**) ou 0,001 (***).

En nous penchant sur d'autres gènes liés à la prolifération cellulaire, nous avons pu observer quelques changements de l'ARNm de certaines de ces protéines connues ou non comme étant des gènes cibles de LRH-1. Nous avons regardé d'autres cyclines soit la G1 (*Ccng1*) et E1 (*Ccne1*), le *Growth Regulating Estrogen Receptor Binding 1* (*Greb1*), une protéine permettant

de médier la prolifération dépendante de l'œstrogène (Chand et al, 2012) et, finalement, *Myc*, un proto-oncogène bien connu (figure 9).

D'abord, pour la lignée MC7-L1 (figure 9A), on n'observe aucun changement significatif pour tous les ARNm à une concentration de 1 μ M de ML180. Pour *Ccne1* et *Ccng1*, on peut observer une diminution pour une concentration de ML180 de 2,5 μ M ($p < 0,05$ pour *Ccne1* et $p < 0,01$ pour *Ccng1*) ainsi qu'à 5 μ M ($p < 0,001$). Pour les ARNm de *Grebl* et *Myc*, on observe une diminution à 2,5 μ M ($p < 0,01$) et à 5 μ M ($p < 0,05$). Ensuite, pour la lignée D2A1 (figure 9B), on n'observe aucun changement significatif pour *Ccne1* et *Ccng1* quoiqu'on puisse observer une légère diminution à 5 μ M pour *Ccne1* et à 2,5 et 5 μ M pour *Ccng1*. Il est à noter que les ARNm de *Grebl* et *Myc* n'ont pas été détectés lors de la qPCR. Finalement, pour ce qui est de la lignée 4T1 (figure 9C), on n'observe aucun changement significatif pour la *Ccng1* et *Myc*. *Ccne1* et *Grebl* n'ont pas été non plus détectés lors du test.

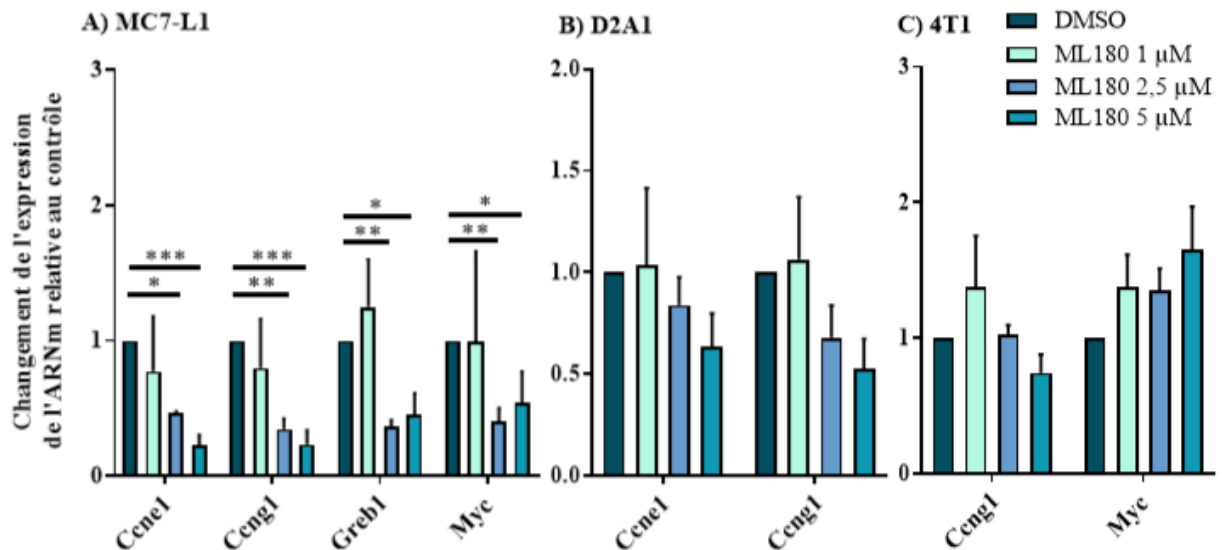


Figure 9 : Abondance relative de l'ARNm des gènes cibles connus ou potentiels de LRH-1 liés à la prolifération cellulaire lors de traitements au ML180.

Mesure de l'expression des ARNm de *Ccne1*, *Ccng1*, *Greb1* et *Myc* dans les cellules traitées à différentes concentrations de ML180 (1, 2,5 et 5 μM) ou au DMSO (contrôle) pour les lignées (A) MC7-L1, (B) D2A1 et (C) 4T1. N=3, ANOVA, p-value < 0,05 (*), 0,01 (**) ou 0,001 (***).

En se concentrant maintenant sur les capacités migratoires et invasives des cellules cancéreuses, nous avons regardé les changements d'abondance d'ARNm de certains gènes facilitateurs de ces capacités. D'abord, au niveau du cytosquelette, nous avons porté notre attention sur deux cadhérines, E (*Cdh1*) et N (*Cdh2*), des molécules d'adhésion pour soutenir les filaments d'actine entre autres, ainsi que la vimentine (*Vim*). De plus, nous nous sommes intéressés à la *Mmp9*, une protéine sécrétée à la surface cellulaire permettant de cliver les composants fibreux de la MEC. Finalement, *Vegf* a aussi fait partie de notre recherche puisque c'est un facteur couramment sécrété par les cellules tumorales pour stimuler l'angiogenèse (figure 10).

Pour la lignée MC7-L1 (figure 10A), les gènes liés au cytosquelette montrent une diminution à

5 μ M de façon drastique pour *Cdh1* ($p < 0,001$) et *Cdh2* ($p < 0,01$) et d'environ de moitié pour *Vim* ($p < 0,01$). On peut également observer une diminution à 2,5 μ M pour *Cdh2* ($p < 0,05$). Pour ce qui est des molécules sécrétées, on ne peut observer aucun changement pour *Mmp9* sauf lorsque les cellules sont traitées avec 1 μ M de ML180, l'abondance augmente ($p < 0,05$), alors que *Vegf* voit son abondance réduire drastiquement à 5 μ M ($p < 0,001$). Pour ce qui est de la lignée D2A1 (figure 10B), aucun résultat n'est significatif, bien qu'on puisse observer une tendance à diminuer pour *Vim* et *Vegf*. Les cadhérines et *Mmp9* n'ont pu être détectés à la qPCR. Finalement, la lignée 4T1 (figure 10C) ne montre aucun résultat significatif ou une réelle tendance pour *Cdh1*, *Vim* et *Vegf*. *Cdh2* et *Mmp9* n'ont pas été détectés.

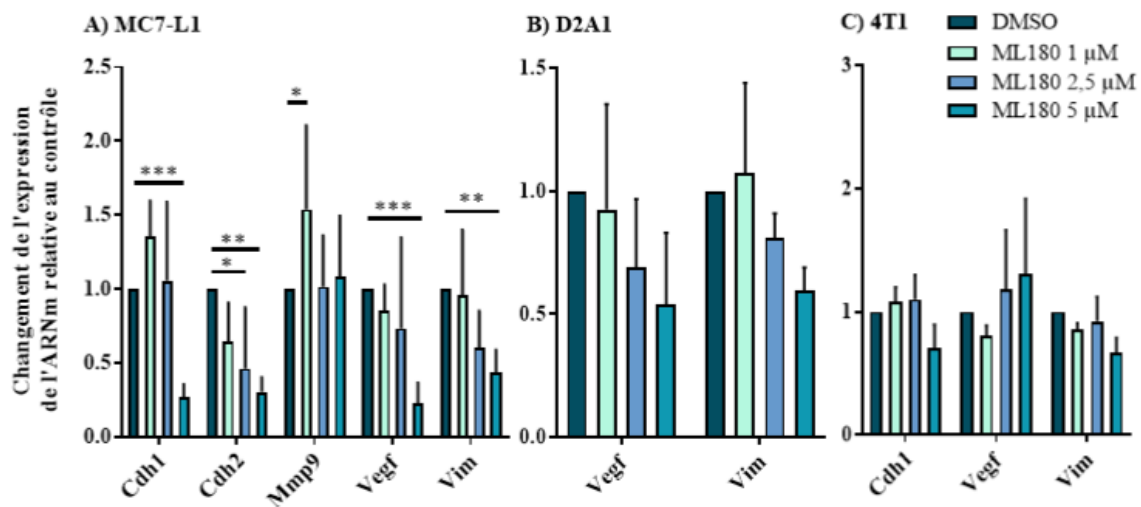


Figure 10 : Abondance relative de l'ARNm des gènes cibles connus ou potentiels de LRH-1 liés à la migration et l'invasion cellulaire lors de traitements au ML180.

Mesure de l'expression des ARNm de *Cdh1*, *Cdh2*, *Mmp9*, *Vegf* et *Vim* dans les cellules traitées à différentes concentrations de ML180 (1, 2,5 et 5 μ M) ou au DMSO (contrôle) pour les lignées (A) MC7-L1, (B) D2A1 et (C) 4T1. N=3, ANOVA, p-value $< 0,05$ (*), 0,01 (**) ou 0,001 (***).

3.1.4 Capacité de migration des cellules cancéreuses lors de traitements avec le ML180

Au niveau phénotypique, nous avons testé la migration des cellules à travers la plaie en mesurant le pourcentage de la densité recouverte dans le temps (figure 11). Après 24 h, on peut observer une densité moindre avec l'augmentation de la concentration de ML180 pour MC7-L1 (figure 11A), mais même le contrôle n'a pas couvert entièrement la plaie contrairement aux deux lignées TN. D'ailleurs, la même tendance se retrouve chez D2A1 (figure 11B) qu'à partir de 2,5 μ M de ML180. Bien que des statistiques ne peuvent s'appliquer puisque ce résultat ne représente qu'un réplicat biologique, ceci soutient que le ML180 réduit la migration de MC7-L1 et D2A1. Alors que la capacité migratoire de la lignée 4T1 (figure 11C) n'est pas affectée par l'agoniste inverse. Même à des concentrations allant jusqu'à 50 μ M de ML180, les cellules finissent par recouvrir complètement la plaie en 24 h (résultats non présentés).

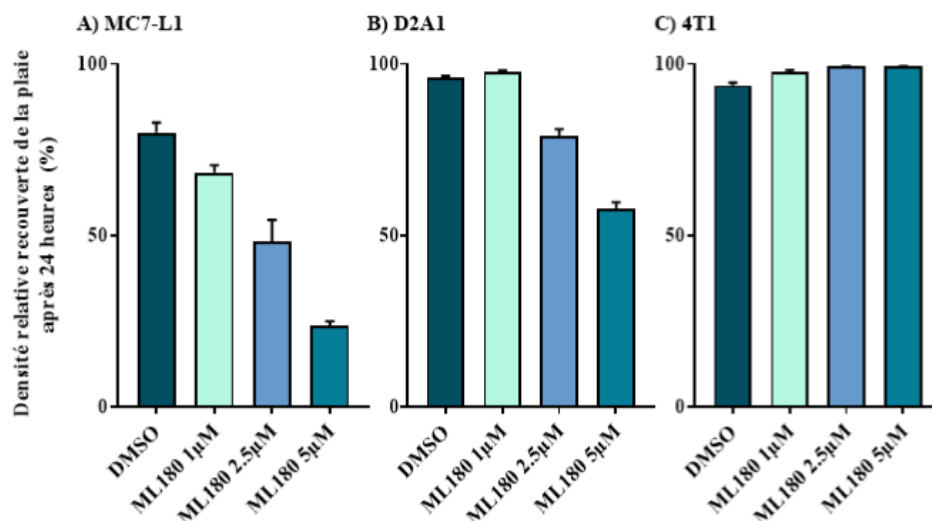


Figure 11 : Migration à travers la plaie des cellules cancéreuses lors de traitements au ML180.

Densité relative recouverte de la plaie (%) après 24 heures pour les lignées (A) MC7-L1, (B) D2A1 et (C) 4T1 dans les conditions contrôle (DMSO) et traitées avec différentes concentrations de ML180 (1, 2,5 et 5 μ M). n= 1.

3.2 Déplétion de LRH-1 par ARN interférent

Une autre façon de réduire l'expression de notre RN est l'emploi d'un ARNsh contre LRH-1. Comme leur nom l'indique, ces constructions lient l'ARNm de la protéine cible pour mener à sa destruction et ainsi empêcher sa traduction (Agrawal et al, 2003). Pour ce faire, des 293T ont été transfectés avec les plasmides pPAX2 et pMD2G ainsi que soit la construction de l'ARNsh humain (shNR5A2 #1-2), souris (shNr5a2 #1-2), la construction contrôle pLKO ou une construction exprimant le fluorophore GFP, pLVTHM. Ce dernier permettait d'évaluer la transfection des cellules, ainsi, pour chaque production de virus, les cellules transfectées avec le plasmide pLVTHM montraient une expression près de 100 % de la protéine GFP par les 293T

l'ayant produit (résultats non présentés).

Par la suite, les huit et cinq transductions en suspension faites aux lignées cellulaires D2A1 et MDA-MB-231, respectivement, ont montré plus de 90 % des cellules exprimant la protéine GFP dans les pétris infectés avec le virus produit avec le pLVTHM (résultats non présentés). Les quantités de virus ayant déjà été optimisées dans notre laboratoire pour MDA-MB-231, les mêmes expériences d'optimisation ont été effectuées pour D2A1 dans le cadre de mon projet ainsi que le choix des deux ARNsh les plus performants parmi les cinq candidats initiaux (annexe D).

3.2.1 Abondance des ARNm de LRH-1 avec les ARNsh

D'abord, nous avons évalué l'efficacité de la transduction des ARNsh par RT-qPCR (figure 12). Pour D2A1, nous avons réussi à obtenir une baisse en moyenne de 50 % de l'abondance de l'ARNm de LRH-1 avec les deux ARNsh (figure 12A). Les résultats ne sont pas significatifs puisque certaines infections n'ont pas été aussi efficaces que d'autres pour détruire l'ARNm de LRH-1 dans les cellules (■, ▲ dans la figure 12A). Pour MDA-MB-231, comme les résultats obtenus précédemment par notre laboratoire, les ARNsh #1 et #2 ont réduit respectivement de 60 à 80 % les niveaux d'ARNm de LRH-1 ($p < 0,001$) (figure 12B).

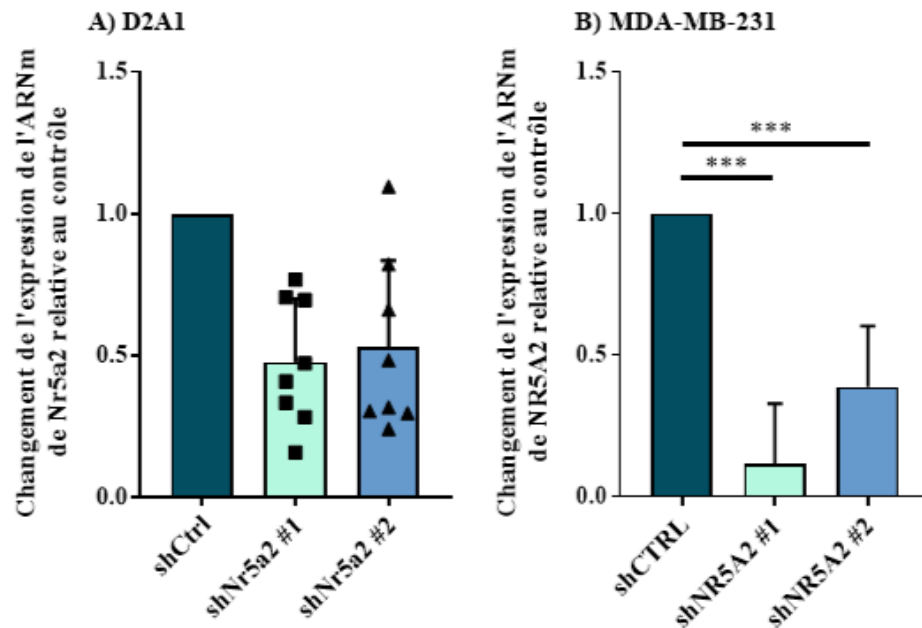


Figure 12 : Abondance relative de l'ARNm de LRH-1 des cellules cancéreuses déplétées ou non pour LRH-1.

Mesure de l'expression des ARNm de *Nr5a2/NR5A2* relative au contrôle pour différentes transductions faites sur les (A) D2A1 et les (B) MDA-MB-231. N = 8 (A), N = 5 (B), ANOVA, p-value < 0,001 (***). Réplicats biologiques de shNr5a2 #1 (■) et de shNr5a2 #2 (▲).

3.2.2 Abondance protéique de LRH-1 avec les ARNsh

Ensuite, nous avons vérifié l'efficacité des ARNsh par immunobuvardage, afin d'observer la diminution de l'abondance protéique de LRH-1 résultant de la dégradation de son ARNm. Les résultats présentés à la figure 13 ont été obtenus à partir d'une même membrane exposée d'abord avec l'Ac de LRH-1, puis HDAC2 et finalement TBP.

Dans les deux types cellulaires, les deux isoformes près de 76 kDa présentes également sur l'immunobuvardage précédent (figure 7) sont aussi exprimées (figure 13). Toutefois, l'abondance de ces isoformes semble augmenter en présence des ARNsh autant pour D2A1 et MDA-MB-231. De plus, le même isoforme de près de 52 kDa est aussi présente pour D2A1, mais n'est pas exprimé par les MDA-MB-231. Son abondance ne change pas chez D2A1 par rapport au contrôle. Il est important de constater que les contrôles HDAC2 et TBP ne sont pas stables entre les contrôles et les ARNsh, et ce pour les deux types cellulaires.

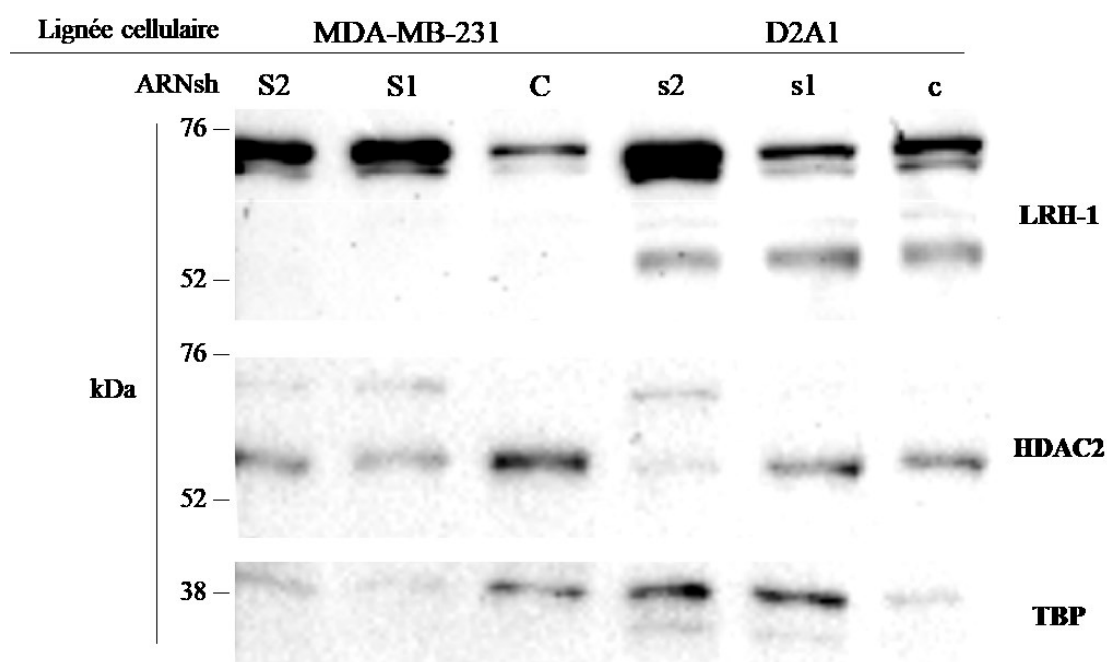


Figure 13 : Immunobuvardage de LRH-1 des cellules cancéreuses déplétées ou non pour LRH-1.

Immunobuvardage contre LRH-1 et les contrôles HDAC2 et TBP pour les lignées cellulaires MDA-MB-231 et D2A1 déplétées ou non pour LRH-1 à l'aide d'ARNsh. Échelle en kilodaltons (kDa). S1, shNR5A2 #1 ; S2, shNR5A2 #2 ; C, shCTRL ; s1, shNr5a2 #1 ; s2, shNr5a2 #2 ; c, shCtrl.

3.2.3 Abondance des ARNm de gènes cibles connus de LRH-1

Afin de rajouter une mesure de l'efficacité de la déplétion de LRH-1, nous nous sommes penchés sur deux gènes cibles connus de LRH-1, soit *Ccnd1/CCND1* et *Cdkn1a/CDKN1A* comme mentionné plus tôt (Bianco et al, 2014b). Pour ce faire, nous avons regardé l'abondance des ARNm pour ces deux gènes (figure 14).

D'abord, pour la lignée D2A1, nous n'observons aucun changement de l'expression pour *Ccnd1* (figure 14A). Toutefois, on peut voir une augmentation drastique de *Cdkn1a* pour shNr5a2 #1 ($p < 0,001$), mais l'abondance pour shNr5a2 #2 demeure inchangée par rapport au contrôle (shCtrl). Ensuite, pour la lignée MDA-MB-231, nous pouvons observer une augmentation de *Ccnd1* pour shNR5A2 #1 ($p < 0,05$), alors que, pour shNR5A2 #2, nous voyons une diminution très claire de son abondance ($p < 0,001$) (figure 14B). Pour ce qui est de *Cdkn1a*, son abondance n'est pas changée pour shNR5A2 #1, mais augmente de façon significative pour shNR5A2 #2 ($p < 0,001$).

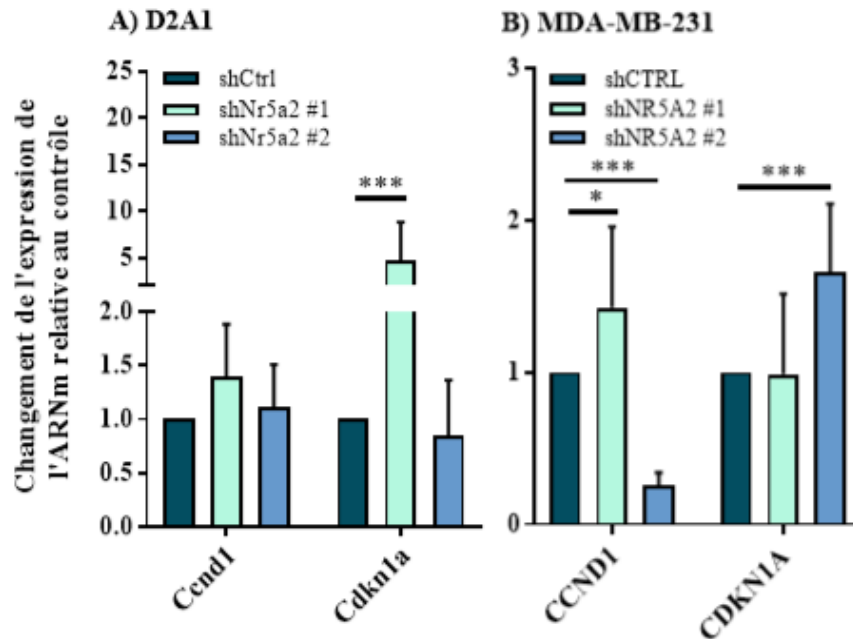


Figure 14 : Abondance relative de l'ARNm des gènes cibles connus de LRH-1 liés à la prolifération cellulaire des cellules cancéreuses déplétées ou non pour LRH-1.

Mesure de l'expression des ARNm de *Ccnd1/CCND1* et *Cdkn1a/CDKN1A* dans les cellules D2A1 (A) et MDA-MB-231 (B) déplétées (shNr5a2 #1-2/shNR5A2 #1-2) ou non (shCtrl/shCTRL) pour LRH-1. N = 8 (A), N = 5 (B), ANOVA, p-value < 0,05 (*) ou 0,001 (***).

3.2.4 Capacité de prolifération des cellules cancéreuses avec les ARNsh

Nous nous sommes attardés aux phénotypes oncogéniques pour évaluer davantage l'efficacité des ARNsh contre LRH-1. D'abord, la prolifération cellulaire a été testée en mesurant la confluence des cellules dans le temps (figures 15 et 16). Nous avons également évalué la vitesse de croissance des cellules en calculant la pente d'une droite linéaire passant à travers la phase exponentielle de prolifération.

En s'attardant d'abord à la lignée MDA-MB-231, on peut observer une abolition complète de la prolifération des cellules déplétées pour LRH-1 (figure 15). Les cellules contrôles montrent, elles-mêmes, une vitesse de croissance faible de 0,41 en comparaison à la vitesse du contrôle des D2A1 d'un ordre de 1,42 (figure 16). En effet, les MDA-MB-231 ont une croissance plus lente que les D2A1 puisque, lors de l'entretien des cellules, les premières devaient être moins diluées (1/5) que les secondes (1/20) pour atteindre une confluence de près de 100 % après 3 ou 4 jours. Ici, pour un même temps d'observation de 10 jours, les MDA-MB-231 n'atteignent pas une confluence totale, et ce même si 4 000 cellules ont étéensemencées en début d'expérience, soit 4 fois plus que les D2A1.

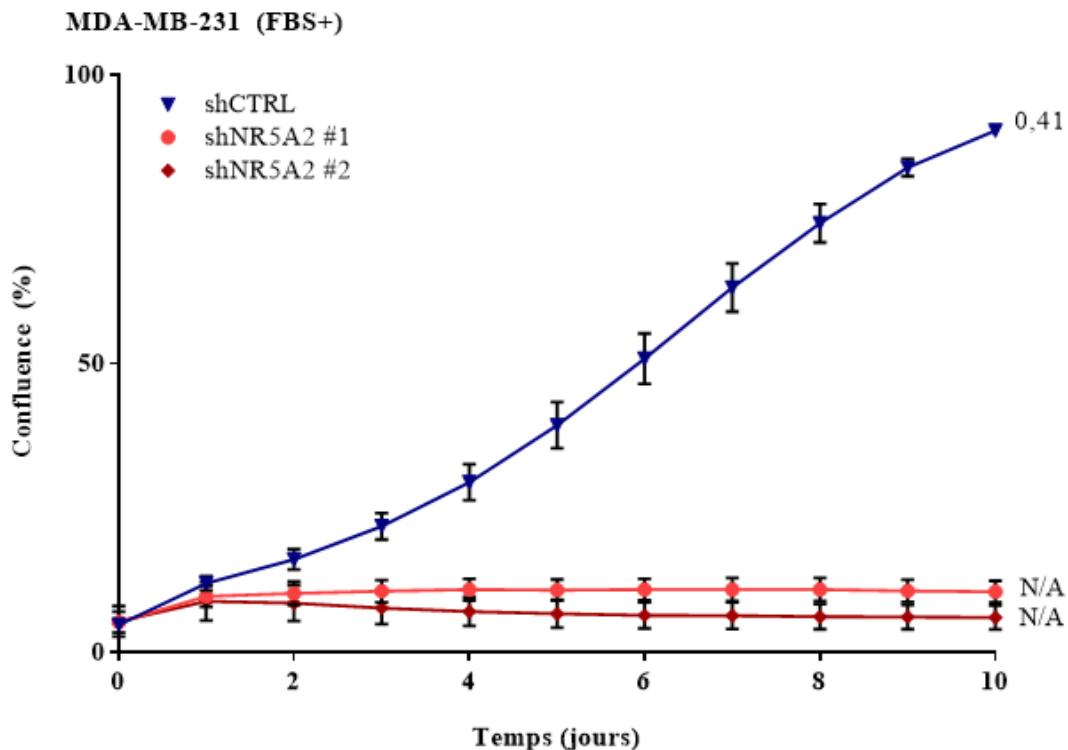


Figure 15 : Prolifération en conditions normales des cellules cancéreuses humaines MDA-MB-231 déplétées ou non pour LRH-1.

Cinétique de prolifération dans des conditions normales (FBS+) des cellules MDA-MB-231 déplétées (shNR5A2 #1-2) ou non (shCTRL) pour LRH-1. N=3, valeur de la pente calculée à l'aide d'une droite linéaire alignée dans la phase exponentielle de la croissance cellulaire. Non applicable (N/A) ; pente incalculable, car aucune croissance.

En regardant maintenant la prolifération de la lignée D2A1, nous pouvons constater un résultat différent (figure 16). Contrairement aux MDA-MB-231, les D2A1 ne voient pas leur croissance abolie par la présence des ARNsh, mais plutôt ralentie. En effet, alors que la vitesse du contrôle (shCtrl) est de 1,42, les vitesses des shNr5a2 #1 et #2 ont des vitesses de l'ordre de 0,68 et 0,60 respectivement. Cette diminution de vitesse est significative pour les deux ARNsh ($p < 0,001$). Il est intéressant de mentionner la rapidité à laquelle le contrôle atteint la confluence de 100 %,

soit environ cinq jours contrairement aux MDA-MB-231. L'appareil utilisé pour ce test, l'*Incucyte*, mesure la surface recouverte par les cellules. Dès lors, même si les cellules continuent de se diviser et s'accumulent en hauteur plutôt qu'en largeur – ce qui est le cas des D2A1 en culture (résultats non présentés) – l'appareil ne peut mesurer une confluence supérieure à 100 %.

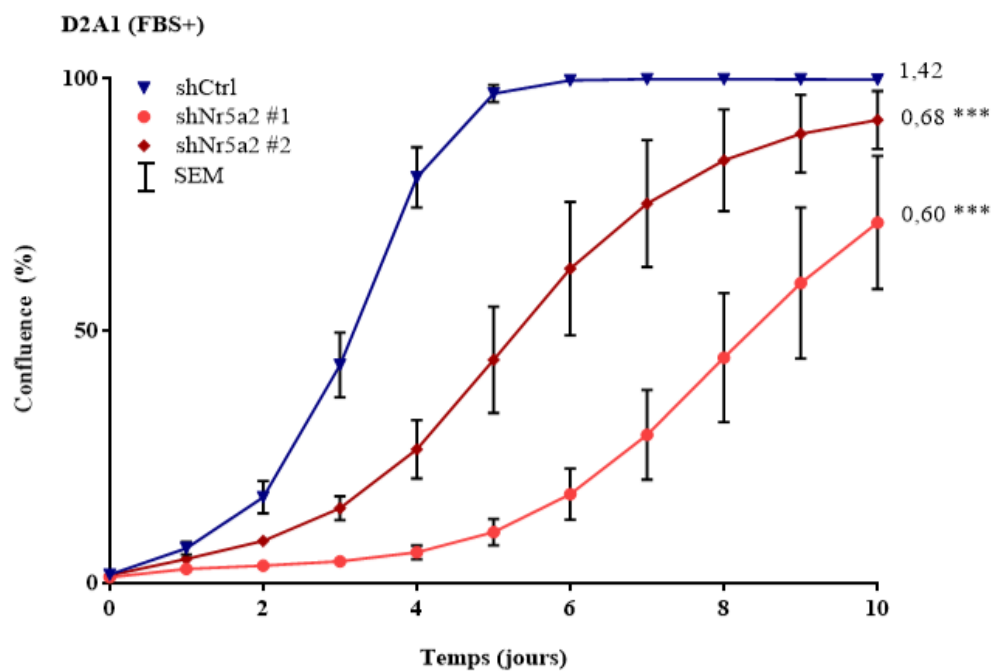


Figure 16 : Prolifération en conditions normales des cellules cancéreuses murines D2A1 déplétées ou non pour LRH-1.

Cinétique de prolifération dans des conditions normales (FBS+) des cellules D2A1 déplétées (shNr5a2 #1-2) ou non (shCtrl) pour LRH-1. N=3, valeur de la pente calculée à l'aide d'une droite linéaire alignée dans la phase exponentielle de la croissance cellulaire, t tests par rapport à la pente contrôle, p-value < 0,05 (*), 0,01 (**) ou 0,001 (***). SEM, erreur standard de la moyenne.

3.2.5 Capacité de migration des cellules cancéreuses avec les ARNsh

Finalement, nous avons testé la capacité migratoire des cellules lorsque déplétées ou non pour LRH-1. Ce phénotype a été testé de deux façons, soit par chimioattraction en chambre de Boyden et par migration à travers la plaie.

D'abord, les cellules ont étéensemencées dans des petites chambres internes avec des pores, qu'on appelle les chambres de Boyden, menant à un puits plus gros en dessous comprenant un chimioattractant. Ici, le chimioattractant consiste simplement en du milieu complet comprenant du FBS, alors que les cellules baignent dans un milieu sans FBS dans la chambre interne (figure 17). Pour la lignée D2A1, nous pouvons observer une diminution de moitié de la moyenne de cellules qui ont migré après 24 h pour shNr5a2 #1 ($p < 0,001$), alors qu'aucun changement significatif n'est observé pour shNr5a2 #2 (figure 17A). Pour la lignée MDA-MB-231, les deux ARNsh ont diminué de façon significative la moyenne des cellules migrées après 24 h ($p < 0,001$) (figure 17B).

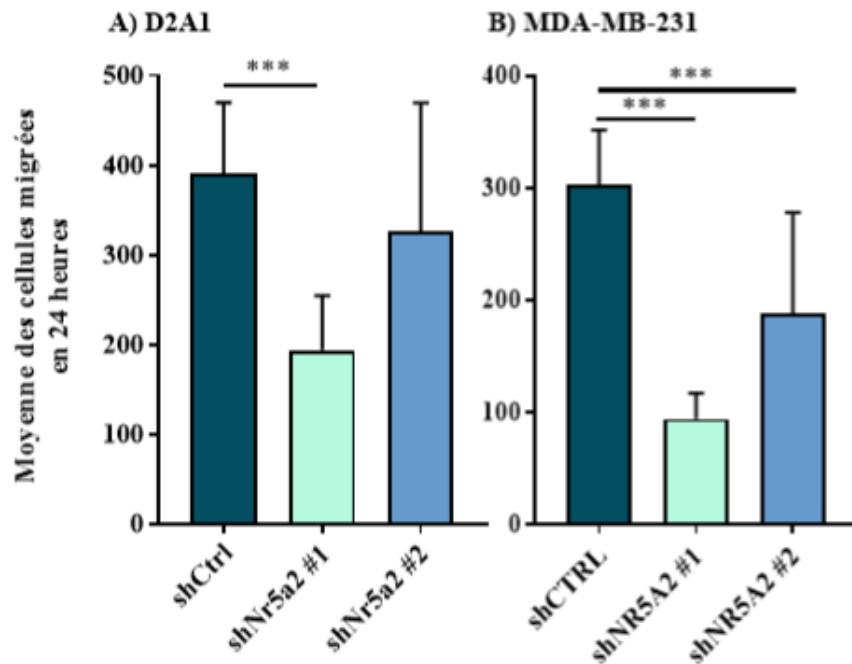


Figure 17 : Migration par chimioattraction en conditions normales des cellules cancéreuses déplétées ou non pour LRH-1.

Moyenne des cellules qui ont migré par chimioattraction en chambre de Boyden après 24 heures pour les lignées (A) D2A1 et (B) MDA-MB-231 dans les conditions de contrôle positif (FBS+). Pour chaque lignée, il y a le contrôle (shCtrl et shCTRL), et les deux ARNsh utilisés (shNr5a2 #1, shNr5a2 #2, shNR5A2 #1 et shNR5A2 #2). N= 3, ANOVA, p-value < 0,001 (***).

Ensuite, nous avons mesuré la migration des cellules d'une seconde façon, soit par la migration à travers la plaie. Encore une fois, le milieu utilisé dans cette expérience est le milieu complet comprenant du FBS. Pour la lignée D2A1, contrairement aux chambres de Boyden, nous pouvons observer une diminution significative de la densité recouverte de la plaie en pourcentage (%) après 24 h ($p < 0,001$) (figure 18). L'expérience n'a pu être réalisée avec les MDA-MB-231 dues à leur mauvaise adhésion au fond du puits et le manque de confluence pour exécuter l'expérience correctement.

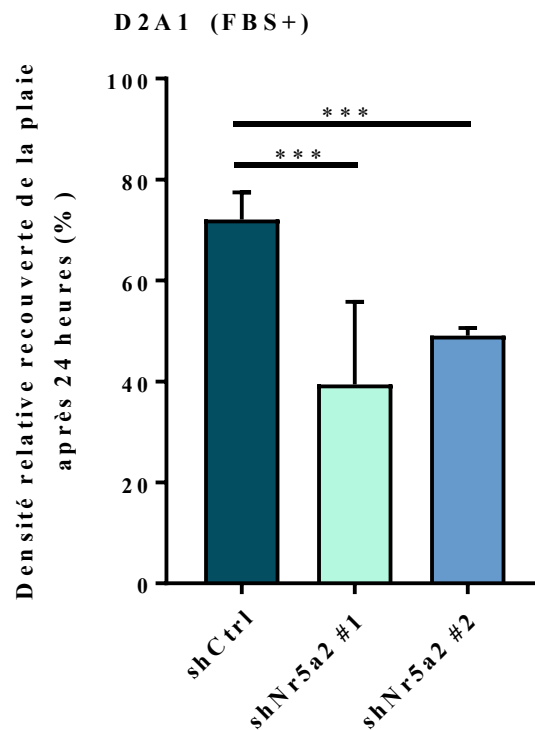


Figure 18 : Migration à travers la plaie en conditions normales des cellules cancéreuses murines D2A1 déplétées ou non pour LRH-1.

Densité relative recouverte de la plaie (%) après 24 heures pour la lignée D2A1 dans les conditions de contrôle positif (FBS+) des cellules déplétées pour LRH-1 (shNr5a2 #1-2) ou non (shCtrl). N = 3, ANOVA, p-value < 0,001 (***).

3.3 Impact du sécrétome des fibroblastes NIH/3T3 sur les phénotypes oncogéniques des cellules cancéreuses murines

Pour la dernière partie de ce projet, nous nous sommes intéressés à l'impact du microenvironnement tumoral, plus particulièrement le sécrétome des CAFs, en étudiant les phénotypes de prolifération et de migration sur les lignées cellulaires D2A1 et MDA-MB-231 déplétées en LRH-1. Afin de simuler l'impact des CAFs sur les cellules tumorales, nous avons utilisé le sécrétome des fibroblastes NIH/3T3.

3.3.1 Capacité de prolifération des cellules cancéreuses dans du milieu de fibroblastes

Pour mesurer l'effet du sécrétome des fibroblastes sur le phénotype de prolifération des cellules cancéreuses, nous avons fait exactement le même test que précédemment avec les ARNsh, mais en utilisant différents milieux. D'abord, le milieu de contrôle positif (FBS+), consistant simplement au milieu utilisé pour les passages cellulaires, a permis aux cellules de proliférer comme attendu autant pour D2A1 (figure 19, points et ligne bleu foncé) que pour MDA-MB-231 (figure 20, points et ligne bleu foncé). Alors que le milieu de contrôle négatif (FBS-), consistant au DMEM avec uniquement des antibiotiques, n'a permis aucune prolifération pour les deux lignées (figures 19 et 20, triangles inversés et ligne bleu pâle). Pour ce qui est du milieu des fibroblastes NIH/3T3, que ce soit la concentration totale (Fibros) ou diluée de moitié dans du milieu FBS- ($\frac{1}{2}$ Fibros), les cellules n'ont pas proliféré au même titre que le contrôle négatif (figures 19 et 20, losanges et ligne rose pour $\frac{1}{2}$ Fibros, triangles inversés et ligne rouge pour Fibros). Il est à noter que nous avons évalué les cellules déplétées pour LRH-1 dans ce test avec les deux lignées cellulaires, mais la prolifération était nulle comme le contrôle (résultats non présentés).

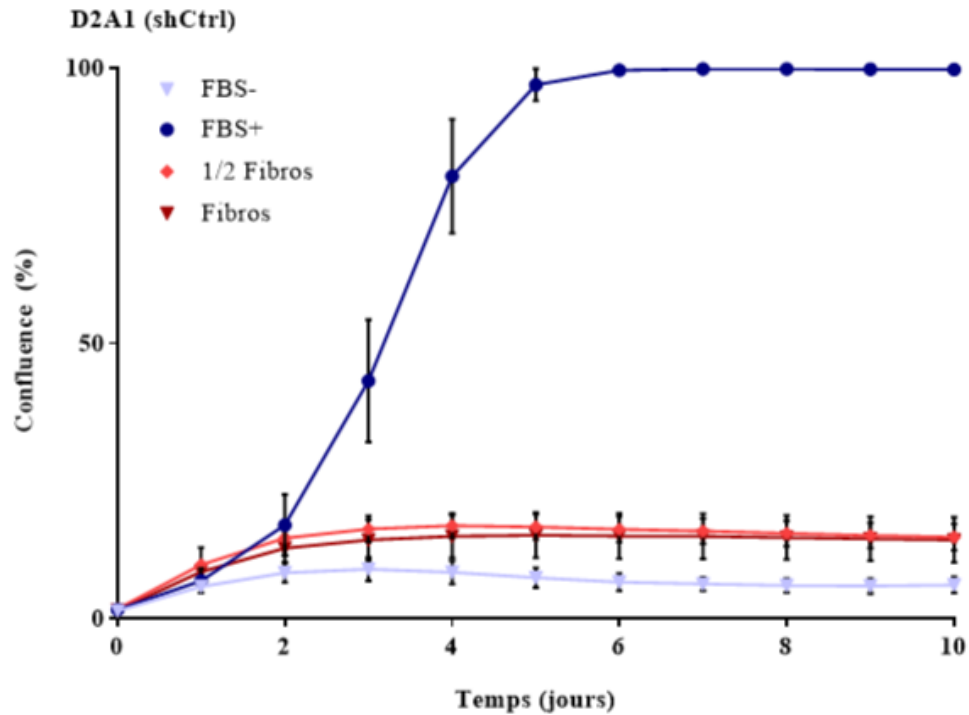


Figure 19 : Prolifération des cellules cancéreuses murines D2A1 dans différents milieux de culture.

Cinétique de prolifération des cellules D2A1 non-déplétées pour LRH-1 (shCtrl). Les milieux utilisés sont le contrôle négatif (FBS-) et positif (FBS+), le sécrétome des fibroblastes NIH/3T3 (Fibros) et une dilution de ce dernier dans du milieu FBS- (1/2 Fibros). N=3.

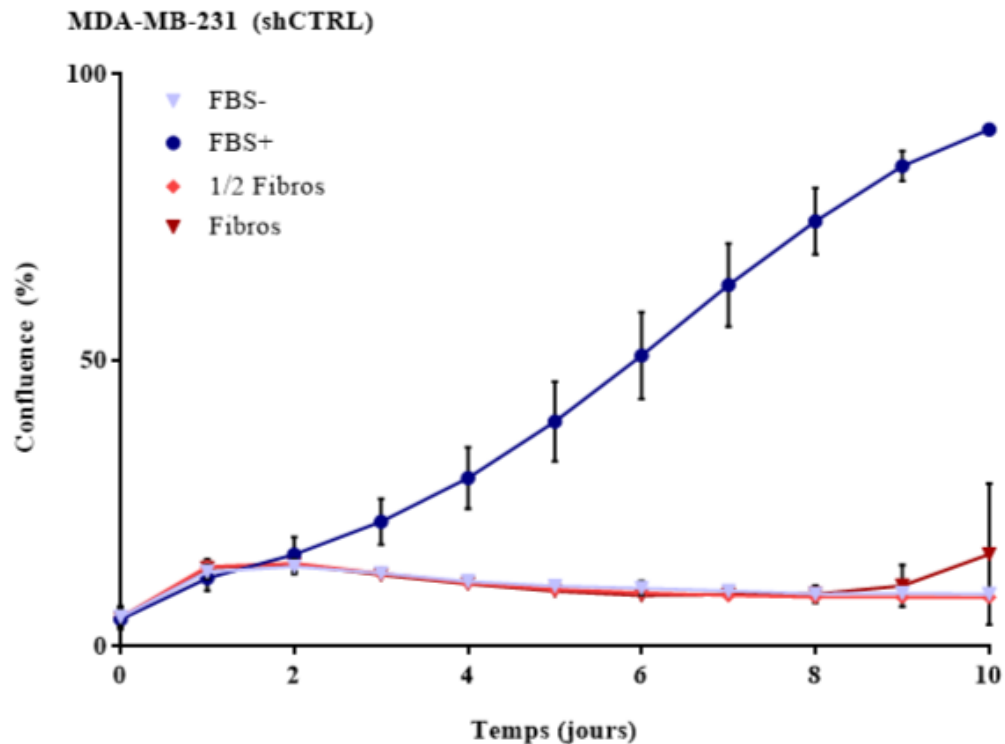


Figure 20 : Prolifération des cellules cancéreuses humaines MDA-MB-231 dans différents milieux de culture.

Cinétique de prolifération des cellules MDA-MB-231 non-déplétées pour LRH-1 (shCTRL). Les milieux utilisés sont le contrôle négatif (FBS-) et positif (FBS+), le sécrétome des fibroblastes NIH/3T3 (Fibros) et une dilution de ce dernier dans du milieu FBS- (1/2 Fibros). N=3.

3.3.2 Capacité de migration des cellules cancéreuses dans du milieu de fibroblastes et l'effet de la déplétion de LRH-1 dans de telles conditions.

Nous nous sommes ensuite penchés sur le phénotype de migration que nous avons testé de deux façons. Nous avons d'abord testé la migration par chimioattraction en chambre de Boyden. Pour ce faire, les cellules ont été placées dans la chambre supérieure dans du milieu pauvre, soit le contrôle négatif (FBS-) et la chambre inférieure comprenaient les différents milieux que nous avons déjà décrit, donc les contrôles négatif (FBS-) et positif (FBS+) en plus du milieu Fibros et ½ Fibros. Comme nous pouvons l'observer dans la figure 21, la lignée D2A1 migre vers le milieu Fibros ou sa dilution (1/2 Fibros) avec la même amplitude que le contrôle positif (FBS+), et ce sans la présence de FBS dans ces milieux (figure 21A). La migration est donc significativement supérieure que le contrôle négatif ($p < 0,001$). Pour ce qui est de la lignée MDA-MB-231, le milieu de Fibros ne stimule pas la migration des cellules comme pour sa consœur murine, l'augmentation faible par rapport au contrôle négatif (FBS-) n'est pas significative (figure 21B). Seul le contrôle positif permet la migration des cellules ($p < 0,001$).

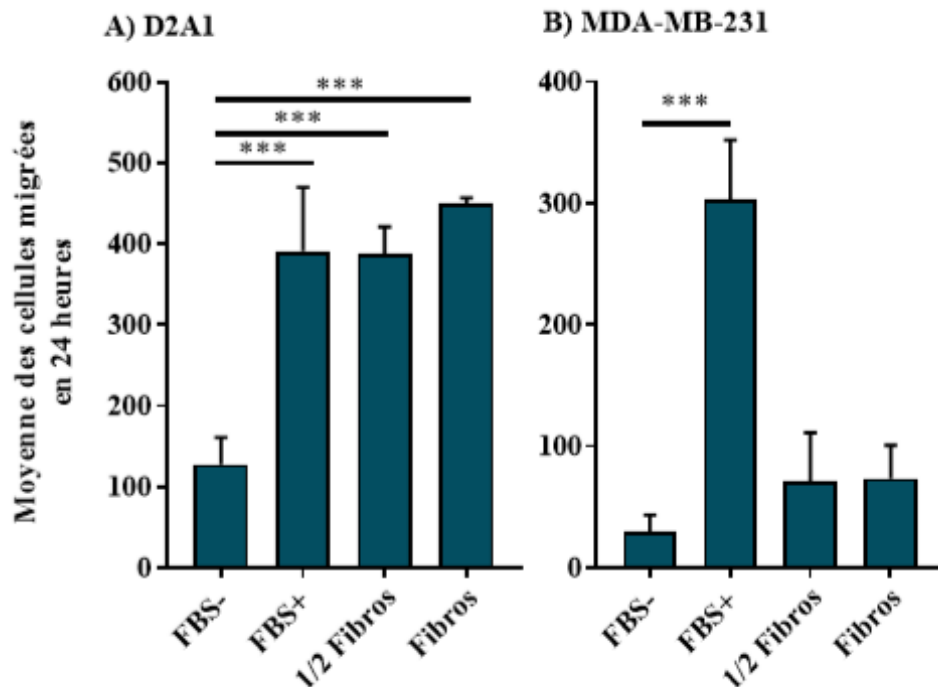


Figure 21 : Migration par chimioattraction des cellules cancéreuses avec différents milieux de culture.

Nombre moyen de cellules qui ont migré par chimioattraction en chambre de Boyden après 24 heures pour les lignées (A) D2A1 et (B) MDA-MB-231. Contrôle négatif (FBS-), contrôle positif (FBS+), milieu de fibroblastes (Fibros), milieu de fibroblastes dilués de moitié (1/2 Fibros). N= 3, ANOVA, p-value < 0,001 (***).

Pour avoir une idée de l'impact de LRH-1 dans cette stimulation de la migration par le sécrétome des CAFs, nous avons exécuté la même expérience en chambre de Boyden avec les ARNsh. Lorsque LRH-1 est déplétée dans la lignée D2A1, la migration est réduite significativement pour les deux ARNsh ($p < 0,001$ pour shNr5a2 #1, $p < 0,01$ pour shNr5a2 #2) (figure 22A). Alors qu'aucun changement n'a été observé pour la lignée MDA-MB-231 (figure 22B).

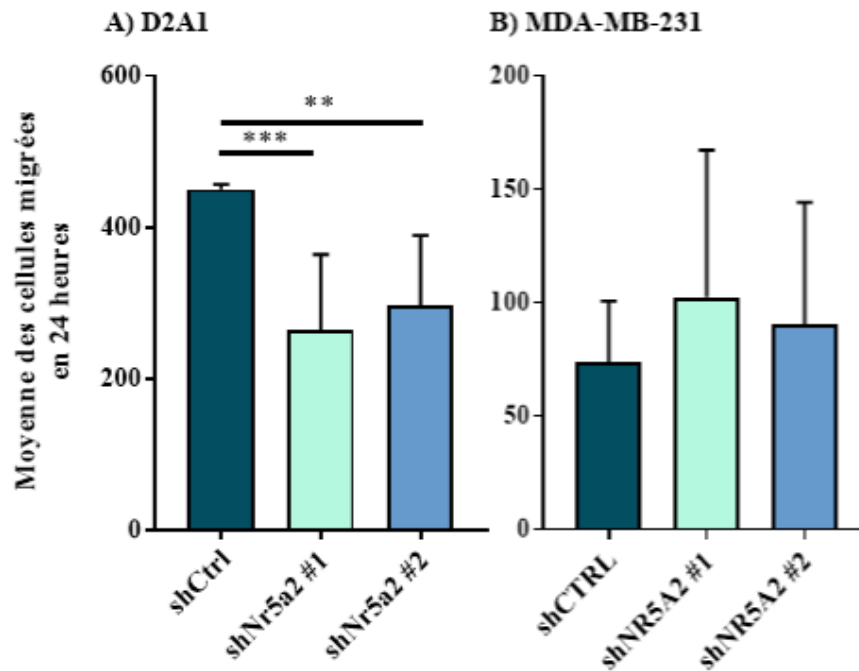


Figure 22 : Migration par chimioattraction des cellules cancéreuses déplétées ou non pour LRH-1 avec différents milieux de culture.

Nombre moyen de cellules qui ont migré par chimioattraction en chambre de Boyden après 24 heures pour les lignées (A) D2A1 et (B) MDA-MB-231 dans les conditions du milieu de fibroblastes (Fibros). Pour chaque lignée, il y a le contrôle (shCtrl et shCTRL), et les deux ARNsh utilisés (shNr5a2 #1-2 et shNR5A2 #1-2). N= 3, ANOVA, p-value < 0,01 (**) ou 0,001 (***).

Une autre façon de tester la migration s'est faite par migration à travers la plaie. Pour des raisons techniques, seule la lignée D2A1 a été testée de cette façon dans cette dernière partie du projet de recherche. Nous avons regardé l'évolution de la surface relative recouverte par les cellules à 6, 12 et 24 heures. Nous pouvons observer, à 6 h, que seul le milieu Fibros augmente de façon significative la migration à travers la plaie ($p < 0,001$) (figure 23A), alors qu'à 12 h, les milieux dilués (1/2 Fibros) ou FBS+ commencent à être significativement plus importantes que le

contrôle négatif ($p < 0,05$) (figure 23B). C'est à 24 h que le milieu FBS+ rattrape au même niveau le milieu Fibros pour l'augmentation significative de la migration ($p < 0,001$) (figure 23C).

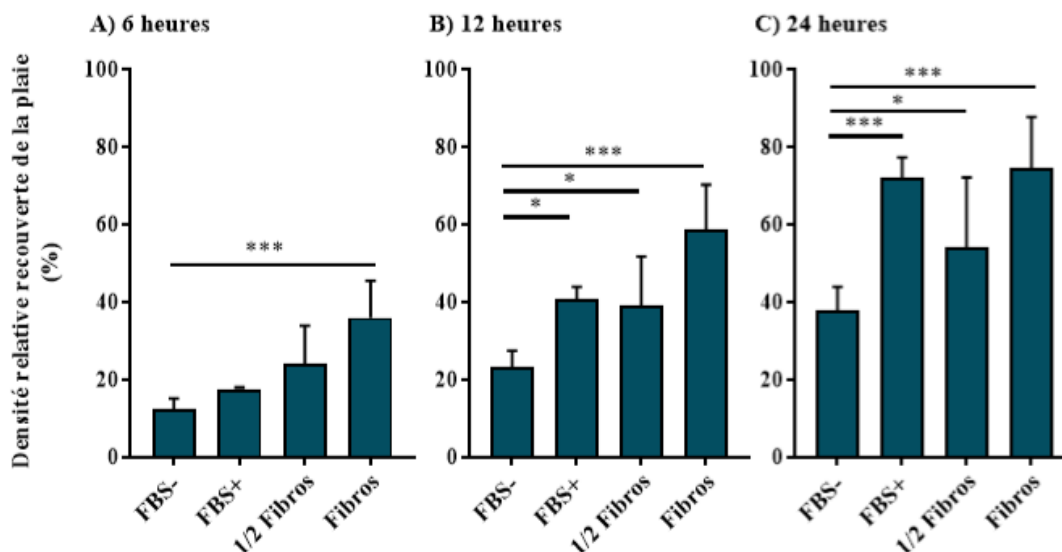


Figure 23 : Migration à travers la plaie des cellules cancéreuses murines D2A1 dans différents milieux de culture et sur différents temps.

Surface relative recouverte de la plaie (%) aux temps (A) 6, (B) 12 et (C) 24 heures pour la lignée D2A1 dans les conditions de contrôle négatif (FBS-), contrôle positif (FBS+), du milieu de fibroblastes (Fibros) et du milieu de fibroblastes dilués deux fois (1/2 Fibros). N= 3, ANOVA, p-value $< 0,05$ (*) ou 0,001 (***).

Finalement, nous nous sommes intéressés à l'impact des ARNsh dans cette expérience afin de venir soutenir le test précédent en chambre de Boyden. Lorsque LRH-1 est déplétée à l'aide du shNr5a2 #1, la migration à travers la plaie est significativement réduite par rapport au contrôle (shCtrl) ($p < 0,001$), mais ce n'est pas le cas du shNr5a2 #2 (figure 24).

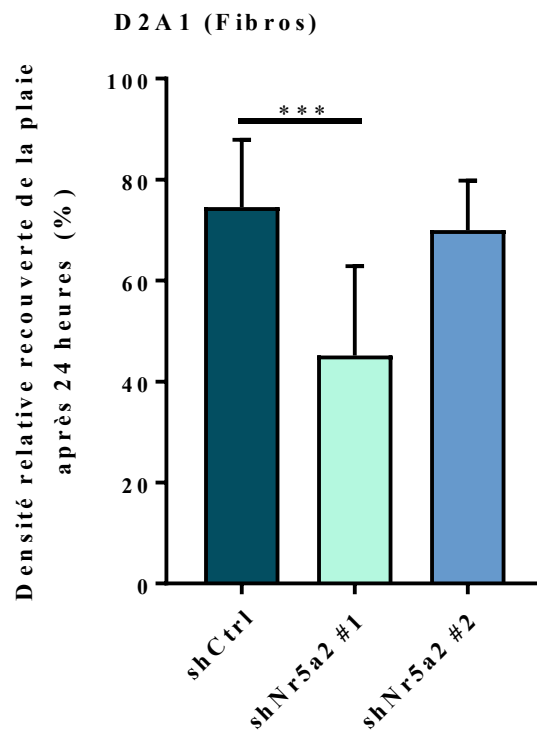


Figure 24 : Migration à travers la plaie des cellules cancéreuses murines D2A1 déplétées ou non pour LRH-1 dans différents milieux de culture.

Surface relative recouverte de la plaie (%) après 24 heures pour la lignée D2A1 dans les conditions du milieu de fibroblastes (Fibros). Le contrôle (shCtrl) est comparé aux deux ARNsh utilisés (shNr5a2 #1-2). N= 3, ANOVA, p-value < 0,001 (***).

CHAPITRE 4

DISCUSSION ET CONCLUSION GÉNÉRALE

4.1 Discussion

4.1.1 Le blocage pharmacologique de LRH-1 avec l'agoniste inverse ML180 : un bon départ *in vitro*

Les premiers essais *in vitro* de l'agoniste inverse de LRH-1, le ML180, sont prometteurs pour la réduction du RN. Bien que l'abondance relative de l'ARNm de LRH-1 ne soit pas affectée par la drogue (figure 6), l'abondance protéique semble touchée (figure 7). Il va de soi puisque la drogue n'agit qu'au niveau protéique en liant cette dernière, bloquant ainsi toutes interactions possibles avec ses coactivateurs (Busby et al, 2010). Il se pourrait que cette liaison mène à sa dégradation ou sa translocation. Des résultats préliminaires de notre laboratoire montraient également la diminution de l'abondance protéique de LRH-1 en immunobuvardage et en immunohistochimie dans des lignées cellulaires humaines comme celle utilisée dans ce projet soit la lignée TN MDA-MB-231 et une autre exprimant ER soit MCF-7 (Bianco, résultats non présentés).

Pour les modèles cellulaires murins, nous avons également observé une réduction des isoformes potentielles de LRH-1 sous 76 kDa et au-dessus de 52 kDa pour les lignées MC7-L1 et D2A1 (figure 7). Ce qui est intéressant c'est que la lignée 4T1 ne semble pas exprimer les isoformes sous 76 kDa, mais uniquement celles au-dessus de 52 kDa en plus de deux autres isoformes plus légères encore (figure 7). Selon le site *Uniprot*, chez la souris, il existe une isoforme décrite de

64 kDa et trois potentielles de 61,5, 57,2 et 15,9 kDa. Ce qui pourrait correspondre aux trois isoformes exprimées par MC7-L1 et D2A1, à l'exception de celle de 15,9 kDa, ainsi que la plus lourde de 4T1. Toutefois, les deux autres isoformes de cette dernière ne correspondent pas à la plus légère de 15,9 kDa non plus puisqu'elles se situent entre 31 et 52 kDa. Ces tailles pourraient être le résultat d'une isoforme tronquée et non dégradée détectée par l'Ac. Il est important de mentionner que nous avons testé également une lignée cellulaire murine de prostate caractérisée pour LRH-1 dans notre laboratoire, la lignée LNCaP, qui nous a servi de contrôle positif pour l'Ac (Bianco, travaux en cours). Nous avons observé les mêmes isoformes que celles présentes pour MC7-L1 et D2A1 sur la figure 7 (résultats non présentés).

Ces résultats suggèrent qu'il y a une réduction de l'abondance protéique de LRH-1 avec 5 μ M de ML180 puisque le contrôle HDAC2 est stable pour chaque échantillon (figure 7). Ces deux expositions proviennent de deux membranes différentes, mais elles ont été produites en même temps, nous pouvons donc être confiants que les puits sont comparables entre les deux membranes. La drogue ML180 semble donc efficace à 5 μ M pour réduire l'abondance protéique de toutes les isoformes présentes dans les lignées MC7-L1 et D2A1, mais ne semble pas affecter les isoformes de la lignée 4T1. Ce dernier point corrèle avec les essais des migrations à travers la plaie (figure 11) où 4T1 n'était pas affecté par la drogue (figure 11C) et ce même jusqu'à une concentration de 50 μ M (résultats non présentés).

Pour mieux explorer l'effet de la drogue ML180, nous avons également regardé l'abondance des ARNm de gènes connus ou potentiels de LRH-1 en lien avec la prolifération et la migration (figures 8 à 10). D'abord, l'abondance des ARNm de *Ccnd1* et *Cdkn1a*, deux gènes cibles connus de LRH-1 (Bianco et al, 2014b ; Lin et al, 2014b), corrèle avec la diminution de l'abondance protéique pour les lignées MC7-L1 et D2A1 (figure 8A, B). La cycline D1 est couramment surexprimée dans les cancers du sein et a été démontrée comme un faible oncogène puisqu'elle stimule la division cellulaire (Barnes et Gillett, 1998). Bien que son expression semble être corrélée avec ER dans le cancer du sein (Ahlin et al, 2017), un lien avec LRH-1 a

toutefois été démontré dans le cancer du pancréas (Lin et al, 2014b). Pour sa part, *Cdkn1a*, tel son nom l'indique, est un inhibiteur de CDK (*Cyclin dependent kinase*), contribuant ainsi à accélérer l'entrée en mitose (Abbas et Dutta, 2009). Fortement exprimé dans le cancer du sein et favorisant la progression de la tumeur (Wei et al, 2015), *Cdkn1a* a également été démontré comme une cible de LRH-1 par notre laboratoire (Bianco et al, 2014b). À la lumière de ces informations, lorsqu'on inhibe LRH-1, on devrait donc s'attendre à voir une diminution de *Ccnd1* et une augmentation de *Cdkn1a*.

En effet, on peut observer une diminution significative de l'expression de *Ccnd1*, entre autres, à 5 μ M de ML180 pour la lignée MC7-L1 et une augmentation significative de *Cdkn1a* pour les deux concentrations précédentes, mais pas pour celle de 5 μ M (figure 8A). Pour expliquer ce phénomène, nous pouvons proposer deux scénarios. Nous faisons peut-être face à une inhibition graduelle dans le temps qui diffère entre *Ccnd1* et *Cdkn1a* ou une compensation des cellules par une autre voie de signalisation lorsque LRH-1 est fortement réduite. Un scénario similaire est présent pour la lignée D2A1 (figure 8B), même si la diminution de *Ccnd1* n'est pas significative à 5 μ M, on peut voir une tendance qui est maintenue comme pour MC7-L1, et l'augmentation de *Cdkn1a* reste significative à 5 μ M contrairement à sa consœur bien qu'on puisse observer une tendance similaire.

Ce qui est particulier est les résultats observés pour la lignée 4T1 (figure 8C), où on ne peut voir aucun changement pour *Ccnd1*. Toutefois, on observe une augmentation significative de *Cdkn1a* à partir de 2,5 μ M de la drogue, et ce même s'il n'y a aucun changement de LRH-1 au niveau protéique et au niveau du phénotype de migration (figure 11C). Il serait possible de remettre en question la spécificité du ML180 à la lumière de ces derniers points, mais étant donné les résultats obtenus dans les lignées humaines MDA-MB-231 et MCF-7 (Bianco, résultats non présentés) et ceux des deux autres lignées murines MC7-L1 et D2A1 comme discuté plus haut, cette hypothèse est peu probable. Nous pourrions plutôt envisager l'implication d'une autre voie de signalisation dans cette lignée cellulaire qui pourrait expliquer

l'augmentation de *Cdkn1a* puisque ce résultat est contradictoire avec le reste des éléments mis de l'avant comme l'abondance protéique de LRH-1 (figure 7), l'abondance d'ARNm de *Ccnd1* (figure 8C) et le phénotype de migration (figure 11C) de la lignée 4T1 avec le ML180.

Nous avons également examiné d'autres gènes liés au cycle cellulaire comme *Ccne1* et *Ccng1*, *Greb1* et le proto-oncogène *Myc* pour savoir s'ils ne pourraient pas être des gènes cibles potentiels de LRH-1 dans le cancer du sein. Il a été démontré, dans les intestins, que LRH-1 interagit avec la β -caténine pour induire *Ccnd1*, *Ccne1* et *Ccng1* (Botrugno et al, 2004). LRH-1 induit également *Ccne1* et *Myc* dans le cancer du foie (Xiao et al, 2018). De plus, la β -caténine a également été démontré comme régulateur de *Myc* et *Cdkn1a* dans le cancer du sein (Xu et al, 2015). Finalement, on sait que LRH-1 régule *Greb1* directement avec ER (Chand et al, 2012). Pris ensemble, nous pouvons suggérer que l'inhibition de LRH-1 donnera une diminution de tous ces gènes si le récepteur est directement lié à leur transcription.

En effet, tous ces gènes semblent affectés par la drogue ML180 à partir de 2,5 μ M dans la lignée MC7-L1 (figure 9A). Mais ce n'est pas le cas pour la lignée D2A1 (figure 9B) et 4T1 (figure 9C) pour les gènes qui ont été détectés. Ce qui semble normal pour la seconde puisque la drogue n'a pas d'effet sur elle, mais ça nous amène à nous questionner lorsqu'on compare les lignées MC7-L1 et D2A1. La meilleure hypothèse qui peut expliquer cette différence, en considérant que LRH-1 est impliqué dans la transcription de ces cyclines, c'est que la différence du profil ER est en cause. En effet, on sait que le patron de transcription de LRH-1 change lorsque ER n'est pas exprimé par la cellule (Bianco, travaux en cours). Par exemple, le gène de *Greb1* est connu pour être transcrit par LRH-1 en présence de ER (Chand et al, 2012), mais ne semble plus du tout exprimé lorsque ER ne l'est pas. Un phénomène similaire pourrait être en cause pour *Ccne1*, *Ccng1* et *Myc*. Il se pourrait également que la lignée D2A1 nécessite plus que 5 μ M de la drogue ML180 pour avoir un effet au même titre que MC7-L1 puisque la migration à travers la plaie est réduite également, mais de moins grand ordre que MC7-L1

(figure 11A, B). Pour ce qui est de la lignée 4T1, il n'y a aucun changement significatif ou tendance observée pour *Ccng1* et le proto-oncogène *Myc* ce qui appuie les propos précédents.

Nous avons également observé des gènes liés à la migration, soit des gènes du cytosquelette comme la vimentine, des molécules de la surface cellulaire comme *Cdh1* et *Cdh2* ou des molécules sécrétées telles *Vegf* et *Mmp9*. Tous ces gènes ont des rôles importants qui peuvent affecter les capacités migratoires des cellules. D'abord les cadhérines ont été démontrées comme jouant un rôle majeur dans la TEM (Hazan et al, 2000 ; Mrozik et al, 2018), ainsi que dans la motilité cellulaire en permettant aux cellules de s'accrocher aux éléments de la MEC (Canel et al, 2013). Nos résultats démontrent que *Cdh1* et *Cdh2* sont significativement réduites lorsque la lignée MC7-L1 est traitée au ML180, particulièrement à 5 μ M (figure 10A). Pour ce qui est de la vimentine, un marqueur connu pour la TEM et favorisant la survie cellulaire (Satelli et Li, 2011), nous observons également une diminution significative. Finalement, la molécule sécrétée *Vegf* servant à stimuler l'angiogenèse (Carmeliet, 2005), est également significativement réduite, mais pas *Mmp9*, une métalloprotéinase qui permet la dégradation des éléments de la MEC (Murphy et Nagase, 2008) (figure 10A). Dans la lignée D2A1, on peut voir une tendance à la baisse de la *Vim* et *Vegf*, alors que les ARNm des autres protéines n'ont pas été détectés par RT-qPCR (figure 10B). Finalement, les ARNm détectés par le test dans la lignée 4T1, soit *Cdh1*, *Vegf* et *Vim*, ne montrent aucun changement, peu importe la concentration de la drogue (figure 10C).

Enfin, lorsqu'on observe les phénotypes de ces lignées lorsque traitées avec le ML180 aux différentes concentrations, on peut être plus confiant sur les hypothèses proposées plus haut. La lignée MC7-L1 montre une forte réduction de la migration à travers la plaie suivant l'augmentation graduelle de la concentration du ML180 (figure 11A). Ceci corrèle avec les résultats d'abondance des ARNm de la vimentine et des cadhérines qui pourraient être liés à ce phénotype. En ce qui concerne la lignée D2A1, on observe également une diminution avec l'augmentation de la concentration de la drogue, mais de façon moins grande que sa consœur

(figure 10B). Ceci appuie l'hypothèse énoncée plus tôt sur la nécessité d'une plus grande concentration de la drogue ML180 puisqu'on peut observer une tendance dans la réduction des gènes liés à la migration et la prolifération sans être significative. Finalement, comme observé pour la lignée 4T1, il n'y a aucun changement de sa capacité migratoire avec la drogue ML180 (figure 10C) et ce même à des concentrations très fortes de 50 μ M (résultats non présentés). Outre pour la lignée 4T1, nos résultats appuient ce qui a déjà été démontré dans le cancer du pancréas (Lin et al, 2014a) et du sein (Chand et al, 2010) où l'augmentation de l'expression de LRH-1 favorise la migration cellulaire. Nous avons démontré ici que l'inhibition de LRH-1 par le ML180 mène à une diminution des capacités migratoires de nos lignées cellulaires.

Nous avons également observé le phénotype de prolifération, où la confluence de la lignée MC7-L1 diminuait avec l'augmentation de la concentration du ML180, et également pour la lignée D2A1 bien que de moins grande envergure (résultats non présentés). Bien qu'aucun test de viabilité cellulaire n'ait été pratiqué, aucune augmentation significative des cellules flottantes dans les pétris n'a été observée lors de ces essais (résultats non présentés).

En bref, le blocage pharmacologique de LRH-1 par la drogue ML180 est efficace pour la lignée MC7-L1, et de façon moins importante pour la lignée D2A1 où une concentration un peu plus importante de la drogue pourrait probablement donner les mêmes résultats que MC7-L1. Toutefois, l'agoniste inverse de LRH-1 n'a eu aucun effet sur la lignée 4T1 ce qui nous porte à nous questionner sur la possibilité que la forme complète de LRH-1 ne soit pas présente chez cette dernière. Bien que l'ARNm de LRH-1 a bel et bien été détecté (figure 6C), il se peut que la séquence reconnue par notre amorce soit conservée dans la forme tronquée que posséderait cette lignée cellulaire.

4.1.2 La déplétion de LRH-1 à l'aide d'ARN interférents : une optimisation supplémentaire nécessaire *in vitro*

La deuxième grande partie de mon projet consiste à la déplétion de LRH-1 à l'aide d'ARN interférents sur la lignée D2A1 en comparaison à la lignée humaine MDA-MB-231. Nous avons sélectionné cette lignée puisque nous nous intéressons davantage au profil TN et que cette lignée répondait à la drogue ML180 au contraire de la 4T1. La lignée MDA-MB-231 a été choisie puisqu'elle a déjà été étudiée dans notre laboratoire (Bianco et al, 2014b) et nous l'utilisons donc comme comparatif pour déterminer les ressemblances et différences du comportement de LRH-1 dans un modèle TN entre la souris et l'humain.

Contrairement à la drogue ML180 qui agit au niveau protéique, les ARN interférents, comme leur nom l'indique, agissent au niveau des ARNm en les liant et les amenant à la dégradation avant même d'être traduits par les ribosomes (Agrawal et al, 2003). Pour la lignée humaine MDA-MB-231, le travail sur l'identification des ARNsh les plus efficaces a déjà été réalisée (Bianco et al, 2014b) correspondant aux séquences G11 et G12 que nous avons nommées shNR5A2 #1-2 (annexe B, figure 30). Les résultats obtenus sur la diminution de l'ARNm de LRH-1 sont significatifs avec une réduction minimale d'environ 60 % (figure 12B). Pour ce qui est de la lignée D2A1, nous avons testé cinq différents ARNsh par RT-qPCR et nos résultats ont permis d'identifier les deux meilleurs pour réduire l'abondance de l'ARNm (annexe D, figure 36), ainsi que par immunobuvardage (annexe D, figure 37). Le choix s'est arrêté aux ARNsh E4 et E6, que nous avons nommés shNr5a2 #1-2 (annexe B, figure 30). Malgré le fait que les résultats d'immunobuvardage n'étaient pas très révélateurs, la diminution au niveau des ARNm était d'au moins 60 % (annexe D, figure 36).

Toutefois, parmi les huit réplicats biologiques qui ont été infectés afin de faire toutes les expériences de ce projet à partir de ce point, la transduction des cellules n'a pas été constante

malgré le respect du protocole, notamment en ce qui concerne les quantités de virus et les temps de chaque infection. En effet, comme on peut l'observer sur la figure 12A, nous notons une réduction de l'abondance de l'ARNm de 50% sans toutefois être significatifs puisque quelques réplicats ont démontré une déplétion moins efficace. Ceci pourrait s'expliquer par le fait que même si on essaye au mieux de respecter les quantités de cellules ou de virus, des différences minimales peuvent avoir des impacts importants sur le résultat final. Cette instabilité entre les réplicats pourrait s'expliquer par l'hétérogénéité de la population de la lignée puisque plusieurs formes de cellules sont visibles dans un même pétri et que les différents passages peuvent sélectionner de façon aléatoire un type ou un autre ce qui pourrait influencer le résultat de la déplétion. De plus, une résistance à la puromycine est moins possible, mais reste envisageable.

Ce qui a été particulièrement problématique dans ce projet c'est l'exécution des immunobuvardages. Malheureusement, le résultat obtenu en première partie avec le blocage pharmacologique (figure 7) n'a pu être obtenu de nouveau. Comme on peut l'observer dans la figure 13, l'abondance des protéines dans chaque puits n'est pas stable selon les deux contrôles HDAC2 et TBP. Un facteur majeur pourrait expliquer ce problème, c'est le fait que les protéines ont été récoltées dans des pétris de 10 cm au lieu de ceux de 15 cm comme les expériences précédentes avec le ML180. La raison de ce choix faisait partie du souci de constance dans les quantités pour maintenir la déplétion le plus possible identique entre les réplicats biologiques. Même si parfois deux pétris de 10 cm étaient récoltés ensemble pour précipiter les protéines, la quantité de cellules, et donc de protéines résultantes, n'y était pas très abondante comparativement aux essais avec le ML180 (résultats non présentés). Aussi, étant donné l'efficacité de la déplétion dans certains essais, particulièrement pour MDA-MB-231, la prolifération étant grandement ralentie, voire même abolie, la confluence pouvait parfois ne pas dépasser 50 % après quatre jours. Donc, l'immunobuvardage en figure 13 n'est pas concluant et ne peut ni confirmer ou infirmer l'efficacité des ARNsh sur la déplétion de LRH-1.

Nous n'avons pas seulement regardé l'abondance des ARNm de LRH-1 pour déterminer l'efficacité des ARNsh, mais également ceux des gènes cibles connus comme *Ccnd1* et *Cdkn1a*. Pour la lignée MDA-MB-231, la déplétion produite par le shNR5A2 #2 est de loin la plus efficace, car *Ccnd1* est réduite de façon significative et *Cdkn1a* a également augmenté de façon significative (figure 14B). Ceci correspond à ce qui a été observé avec le ML180 et corrèle avec les résultats obtenus avec des lignées humaines dans notre laboratoire (Bianco et al, 2014b). Mais, le shNR5A2 #1 ne donne pas ces résultats, montrant plutôt une augmentation de *Ccnd1* et aucun changement pour *Cdkn1a*. Ceci est contradictoire avec d'autres résultats. En effet, on remarque que les deux ARNsh abolissent la prolifération des cellules (figure 15) et réduisent de façon significative la migration par chimioattraction (figure 17B). Du côté de la lignée D2A1, nous pouvons observer qu'il n'y a aucun changement pour *Ccnd1*, mais une augmentation significative de *Cdkn1a* uniquement pour le shNr5a2 #1 (figure 14A). Ceci corrèle également avec les essais de prolifération où le shNr5a2 #1 est plus efficace pour la ralentir que le shNr5a2 #2 (figure 16). Toutefois, ce dernier réduit également la prolifération, mais aucun changement n'est observé dans l'abondance des ARNm pour la *Ccnd1* et *Cdkn1a* (figure 14A). Ces résultats suggèrent que LRH-1 puisse agir sur la prolifération des cellules via la transcription d'autres gènes et rentre en contradiction avec les résultats obtenus avec le ML180 (figure 8B).

C'est en regardant les phénotypes de prolifération et de migration que les résultats sont plus prometteurs quant à l'efficacité des ARNsh. D'abord, la prolifération de la lignée MDA-MB-231 est parfaitement abolie par la présence des ARN interférents comme on l'avait déjà mentionné précédemment (figure 15), ce qui avait aussi été montré dans notre laboratoire (Bianco et al, 2014b). Pour ce qui est de la lignée D2A1, l'effet des ARNsh sur la prolifération n'est pas aussi drastique que pour la lignée humaine. En effet, on peut observer un ralentissement de la prolifération lorsque LRH-1 est déplété (figure 16). Afin de pouvoir déterminer l'ampleur de la réduction, nous avons mesuré la vitesse de croissance en faisant passer une droite dans la partie exponentielle de la courbe sigmoïde (chiffres sur la figure 16). La vitesse de croissance du contrôle est près de deux fois plus rapide que les lignées traitées avec les ARNsh, le shNr5a2 #1 étant plus lent que le shNr5a2 #2. Donc, lorsque LRH-1 est

déplété, la croissance cellulaire est stoppée chez la lignée cellulaire humaine, mais ralentie chez la lignée cellulaire murine. Bien que l'abondance des ARNm de *Ccnd1* et *Cdkn1a* ne donne pas les résultats escomptés tels les essais avec le ML180, les essais de prolifération soutiennent le rôle de LRH-1 dans la prolifération cellulaire comme il a été démontré dans divers cancers (Botrugno et al, 2004 ; Chand et al, 2012 ; Xiao et al, 2018 ; Xu et al, 2015).

En regardant maintenant la migration cellulaire, nous l'avons testée de deux façons. D'abord en chambre de Boyden, ce qui permettait de compter le nombre de cellules qui migrent vers le milieu avantageux (FBS+) après 24 h, ainsi que par migration à travers la plaie pour évaluer la densité de cellules qui la recouvre après 24 h. D'abord, pour la lignée MDA-MB-231, la moyenne de cellules qui ont migré après 24 h a diminué de façon significative pour les deux ARNsh, le shNr5a2 #1 ayant un effet plus important que le shNr5a2 #2 (figure 17B). Ceci vient mettre l'appui sur le rôle de LRH-1 dans le caractère agressif des modèles TN (Bianco, travaux en cours ; Pang et al, 2017). Le même scénario se retrouve dans la lignée D2A1, mais le shNr5a2 #2 n'a pas réduit de façon significative la moyenne des cellules qui ont migré (figure 17A). Ceci peut s'expliquer par le fait que l'un de ces réplicats biologiques était l'un de ceux qui n'avaient pas réduit l'abondance en ARNm de LRH-1 (figure 12A, triangle noir le plus haut). On peut être sûr que ces deux ARNsh sont efficaces à réduire la migration des cellules lorsqu'on regarde la migration à travers la plaie, où les deux shNr5a2 ont diminué de façon significative la densité relative recouverte après 24 h (figure 18). Ce test n'a pas pu être fait avec la lignée MDA-MB-231 puisque cette lignée ne croît plus du tout après l'infection comme on l'a vu dans le test de prolifération, ce qui rendait impossible de produire une confluence de 100 % pour pouvoir faire la plaie. Pris ensemble, nos résultats démontrent que l'inhibition de LRH-1, même partielle, contribue à diminuer les capacités migratoires chez nos lignées cellulaires. Ceci appuie les résultats obtenus avec le ML180 et ce qui a déjà été observé dans le cancer du pancréas (Lin et al, 2014a) et du sein (Chand et al, 2010).

En résumé, les ARN interférents sont prometteurs également pour dépléter LRH-1 dans la lignée humaine MDA-MB-231, mais beaucoup de travail reste à faire pour la lignée D2A1 concernant l'efficacité de déplétion des ARNsh. Il sera nécessaire d'exécuter plusieurs contrôles avec les plasmides utilisés. En effet, il pourrait y avoir un problème avec les plasmides pPAX2 et pMD2G. On peut observer dans la figure 35 (annexe B) que la digestion enzymatique de pPAX2 donne des fragments de grandeur qui ne correspondent pas à ce qui est attendu (annexe B, figure 33). Tandis que la non-digestion de pMD2G et sa digestion par SpeI donnent le même nombre de fragments (annexe B, figure 35), ce qui ne correspond pas à ce qui devrait être attendu non plus (annexe B, figure 34). Ceci pourrait affecter la qualité de la déplétion de la lignée D2A1, pourtant il n'a pas eu d'impact sur la déplétion de LRH-1 dans les MDA-MB-231, alors que les deux plasmides ont été utilisés pour toutes les infections.

4.1.3 Le fibroblaste : un élément prometteur du microenvironnement tumoral

L'impact du microenvironnement tumoral sur les cellules cancéreuses est admis depuis plusieurs années par la communauté scientifique. Nous savons qu'il existe plusieurs relations réciproques entre les cellules tumorales et les composants du stroma qui contribuent à l'initiation et la progression tumorale (Balkwill et al, 2012). Parmi les nombreux éléments que compose cet environnement, les fibroblastes sont les cellules présentes en grande majorité. Ces fibroblastes stimulés par les cellules tumorales à modifier leur phénotype pour devenir des CAFs vont contribuer à la malignité de la masse tumorale.

Dans le cadre de mon projet, nous avons étudié le sécrétome de tels CAFs sur nos cellules tumorales murines (D2A1) et humaines (MDA-MB-231). Pour ce faire, nous avons utilisé le sécrétome des fibroblastes NIH/3T3. Comme nous l'avons déjà mentionné, les NIH/3T3 ne sont pas des CAFs murins, mais bien des fibroblastes embryonnaires (Aaronson et Todaro,

1968). Toutefois, il a été démontré que les NIH/3T3 expriment certains marqueurs des CAFs comme l'actine SMA- α (Leavitt et al, 1985). Ils sont grandement utilisés par le laboratoire du Pr Benoît Paquette (Ph. D.) où ils stimulent la migration et l'invasion des cellules tumorales TN dans des essais *in vitro* (Paquette et al, 2011). De plus, une étude récente a démontré que ces fibroblastes stimulent l'angiogenèse dans des essais *in vitro* également (Lee et al, 2018). Pour toutes ces raisons, nous avons également pris ce modèle cellulaire murin pour simuler l'effet des CAFs dans nos essais.

Tout d'abord, nous nous sommes penchés sur le phénotype de prolifération. L'essai consistait à l'ensemencement des cellules à faible confluence dans les milieux décrits au point 2.4, soit le sécrétome des NIH/3T3 (Fibros), une dilution de ce dernier ($\frac{1}{2}$ Fibros) ainsi que les contrôles positif (FBS+) et négatif (FBS-). L'évolution de la confluence a été suivie sur dix jours. Nous en avons soutiré que seul le contrôle positif comprenant tous les éléments pour la culture cellulaire a permis la croissance des cellules autant pour la lignée D2A1 (figure 20) que MDA-MB-231 (figure 21). Toutefois, en migration par chimioattraction, le sécrétome des fibroblastes embryonnaires a stimulé la migration des cellules D2A1 au même niveau que le contrôle positif, et ce, sans la présence de FBS dans leur milieu (figure 22A). Ce n'est pas toutefois pas le cas pour la lignée MDA-MB-231 (figure 22B). En vérifiant la migration à travers la plaie sur le temps pour la lignée D2A1, nous avons pu observer qu'au bout de 24 h, la migration était au même niveau que le contrôle positif (figure 24C), comme dans le test en chambre de Boyden. Chose intéressante, c'est qu'à des heures antérieures, on peut observer une migration plus importante pour le milieu Fibros que le contrôle positif FBS+ à 6 et 12 heures (figure 24A, B). Nous pouvons donc suggérer que le sécrétome des NIH/3T3 stimule de façon plus efficace la migration des cellules que le FBS, mais semble s'épuiser plus rapidement ce qui amène les cellules cancéreuses dans le contrôle positif à rattraper celles du milieu de fibroblastes.

Ces résultats nous permettent de suggérer plusieurs choses. D'abord, le sécrétome n'affecte pas la prolifération des cellules, ni murines ou humaines. Ceci pourrait s'expliquer par le fait que

les cellules cancéreuses ont déjà la capacité de proliférer de façon aberrante à l'intérieur du canal mammaire. Nous pouvons donc assumer que la présence des CAFs dans l'environnement immédiat des cellules tumorales ne les "nourrit" pas, mais nous pouvons plutôt penser qu'avec leurs fonctions de remodelage de la MEC, ils permettent l'accessibilité de nutriments aux cellules, mais ils n'en sécrètent pas directement. Toutefois, comme plusieurs études l'ont démontré, les CAFs contribuent de façon significative à la migration des cellules par les nombreuses fonctions liées au remodelage de la MEC, mais également la sécrétion de facteurs qui vont engendrer des voies de signalisation pour promouvoir la motilité des cellules cancéreuses dans l'environnement dense qui a été construit autour d'eux (Gaggioli et al, 2007 ; Santi et al, 2018 ; Tang et al, 2016).

Le sécrétome des NIH/3T3 n'affecte toutefois pas la lignée MDA-MB-231, autant au niveau de la prolifération comme son homologue murin, mais également au niveau de la migration au contraire de D2A1. Ceci pourrait s'expliquer par deux hypothèses. La première se base sur le principe de conservation à travers les espèces. En effet, il peut manquer de spécificité entre les molécules sécrétées par les fibroblastes murins et les récepteurs humains des cellules cancéreuses. Par exemple, selon le site *NCBI blast*, les molécules de TGF- β 1, un des facteurs les plus abondants du sécrétome des CAFs, sont à 89 % semblable entre les souris et les humains. Cependant, pour une autre molécule normalement sécrétée par les CAFs comme l'EGF, la ressemblance est seulement de 61 %. Ce manque de conservation pourrait expliquer que le sécrétome des NIH/3T3 n'a eu aucun impact sur les MDA-MB-231.

La deuxième hypothèse fait référence à un principe d'indépendance des cellules cancéreuses. Ce principe stipule que les cellules cancéreuses gagnent en indépendance lors de la progression tumorale. Les cellules dépendent donc beaucoup des fibroblastes et du milieu environnant au début de la tumorigenèse, mais au fur et à mesure que les cellules progressent et deviennent métastatiques, elles sont alors indépendantes et peuvent avec une plus grande facilité à former des foyers tumoraux ailleurs dans le corps (Elenbaas et Weinberg, 2001). Ici, notre lignée D2A1

provient d'un carcinome non invasif chez la souris (annexe A, figure 26), mais la lignée MDA-MB-231 provient d'un nodule pulmonaire (annexe A, figure 28). Nous avons donc une lignée qui serait encore dépendante de son milieu d'origine et donc réagit à la stimulation du sécrétome des NIH/3T3, et nous avons une lignée métastatique qui s'est développée dans un autre organe de façon tout à fait indépendante. Ceci pourrait expliquer pourquoi la lignée MDA-MB-231 n'est pas affectée par le sécrétome des NIH/3T3.

Finalement, pour savoir si le sécrétome des fibroblastes affecte l'activité de LRH-1, nous avons étudié les phénotypes de prolifération et de migration des lignées cellulaires lorsqu'elles sont déplétées pour LRH-1. Étant donné que la prolifération n'a pas été affectée dans les lignées contrôles, nous n'avons également vu aucun changement avec les lignées déplétées (résultats non présentés). Au niveau de la migration, nous n'avons également observé aucun changement pour la lignée MDA-MB-231 déplétée (figure 23B). Cependant, du côté de la lignée D2A1, lorsque les cellules sont déplétées pour LRH-1, la migration est réduite de presque moitié pour les deux ARNsh en chambre de Boyden (figure 23A), mais uniquement pour le shNr5a2 #1 en migration par plaie après 24 h (figure 25). Ce dernier résultat peut s'expliquer par certains réplicats biologiques dont la déplétion n'a pas été optimale comme nous en avons déjà discuté précédemment (point 4.1.2).

Ceci suggère qu'il pourrait avoir un lien avec le sécrétome des CAFs et LRH-1. Toutefois, il serait nécessaire d'avancer davantage la recherche pour pouvoir conclure à un lien. Il serait pertinent d'identifier les molécules présentes dans le sécrétome des NIH/3T3 et faire la comparaison avec des CAFs par précipitation protéique et spectrométrie de masse. Une étude similaire avait été faite (Leavitt et al, 1985), mais celle-ci a été réalisée avec des fibroblastes hépatiques de rat et non pas des CAFs murins ou humains.

4.2 Conclusion générale

Comme ce projet comporte trois grandes parties, nous pouvons en tirer trois grandes conclusions. D'abord, la drogue ML180 semble efficace pour la réduction de l'abondance protéique de LRH-1 lorsque ce dernier est exprimé par les cellules cancéreuses murines. Ensuite, la déplétion de LRH-1 pour la lignée murine est encore à optimiser pour atteindre une constance de résultats, mais nous pouvons suggérer que la déplétion affecte la prolifération des cellules, de façon plus importante chez l'humain, et affecte également la migration. Finalement, les expériences impliquant les NIH/3T3 nous suggèrent que leur sécrétome n'affecte pas la prolifération des cellules, mais bien la migration des cellules cancéreuses murines seulement. Ainsi, LRH-1 jouerait bien un rôle sur la prolifération et la migration, et ce probablement par des voies de signalisation différentes puisque le sécrétome des CAFs pourraient être impliqué que dans la voie menant à la migration.

Ce projet s'inscrit dans le cadre d'un autre projet visant à développer un modèle *in vivo*. De nombreuses études *in vivo* utilisent des modèles de xénogreffe, c'est-à-dire la transplantation d'un greffon d'une espèce animale dans une autre espèce, plus précisément des cellules humaines dans des souris immunodéficientes. Ce modèle a de nombreux avantages, car les cellules humaines sont souvent mieux caractérisées et leurs réponses aux traitements peuvent plus facilement être appliquées aux cas cliniques. Toutefois, l'immunodéficiência nécessaire pour éviter le rejet du greffon fait ainsi fi de la réaction inflammatoire qui joue un rôle important dans la tumorigenèse. C'est pourquoi une partie de mon projet permet de caractériser la lignée cancéreuse murine TN D2A1 en la comparant à la lignée humaine TN MDA-MB-231 dans des essais *in vitro* afin d'être éventuellement utilisée à construire un modèle *in vivo* sans immunodéficiência. Il n'en demeure pas moins que plusieurs tests de validation doivent être faits avant de se lancer dans un modèle *in vivo*, mais mes résultats soutiennent l'hypothèse selon laquelle LRH-1 est une cible potentielle dans la tumorigenèse mammaire.

ANNEXES

ANNEXE A – Historique des cellules cancéreuses utilisées dans le projet de recherche.

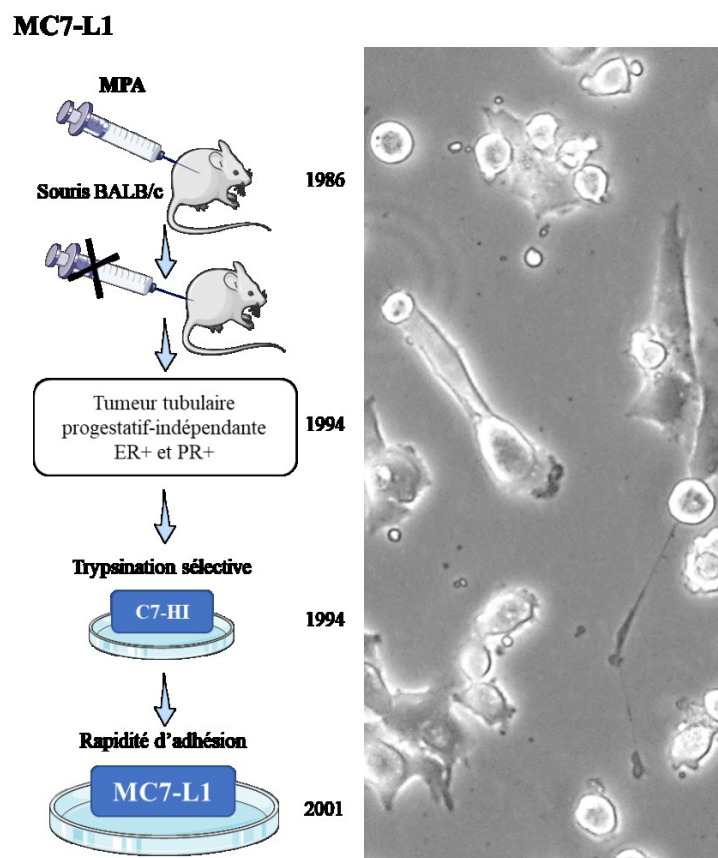


Figure 25 : Présentation de la lignée murine MC7-L1.

À gauche, le schéma illustrant l'élaboration du modèle cellulaire au cours des années. À droite, photographie des cellules utilisées dans le projet. ER, récepteur de l'œstrogène; PR, récepteur de la progestérone; MPA, acétate de médroxyprogestérone.

D2A1

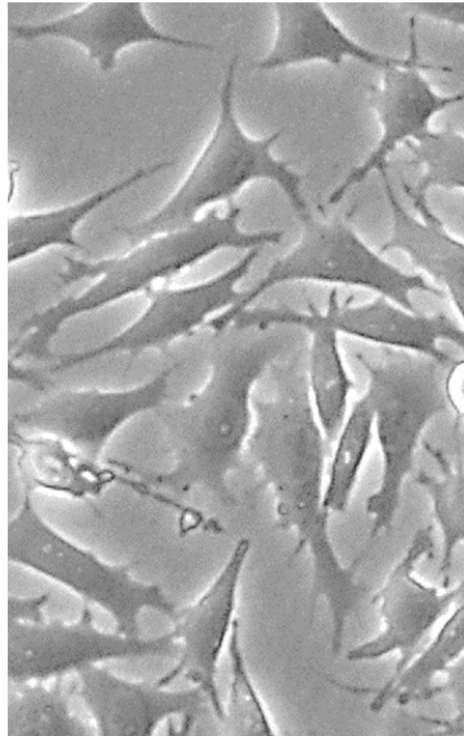
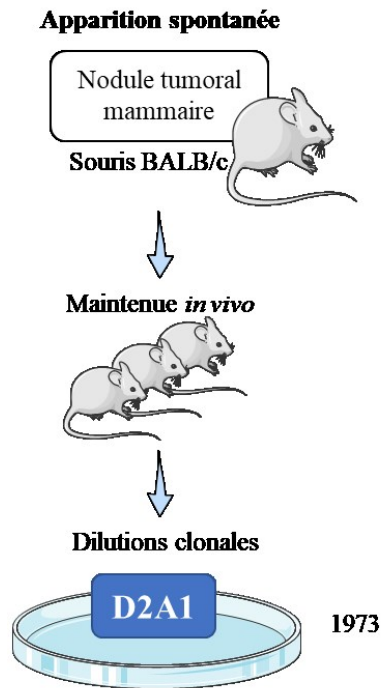


Figure 26 : Présentation de la lignée murine D2A1.

À gauche, le schéma illustrant l'élaboration du modèle cellulaire au cours des années. À droite, photographie des cellules utilisées dans le projet.

4T1

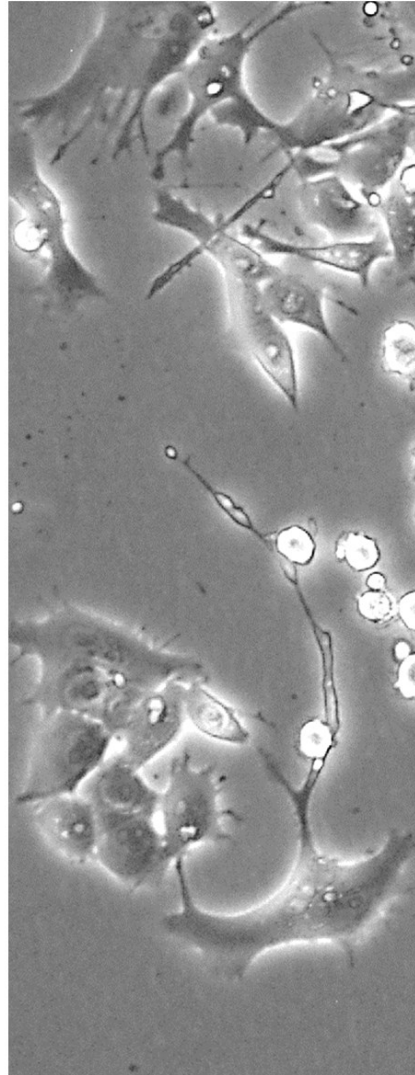
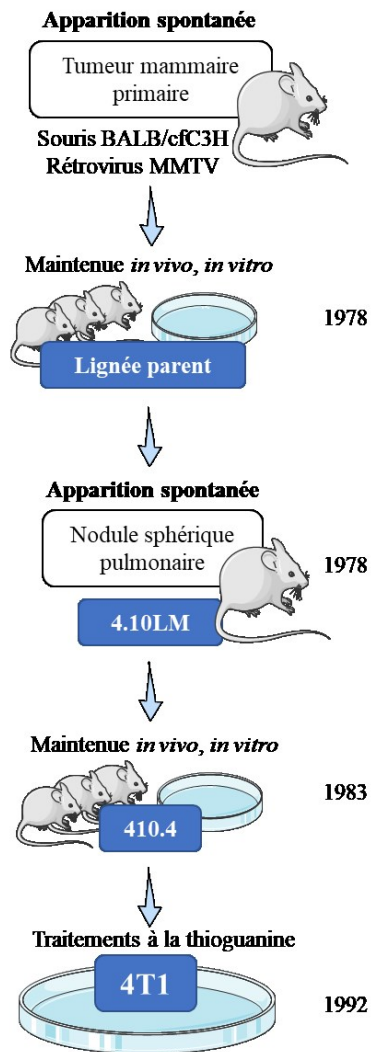


Figure 27 : Présentation de la lignée murine 4T1.

À gauche, le schéma illustrant l'élaboration du modèle cellulaire au cours des années. À droite, photographie des cellules utilisées dans le projet. MMTV, virus facilitateur de cancer.

MDA-MB-231

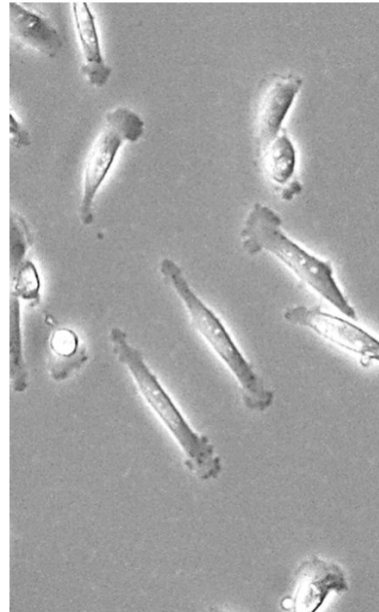
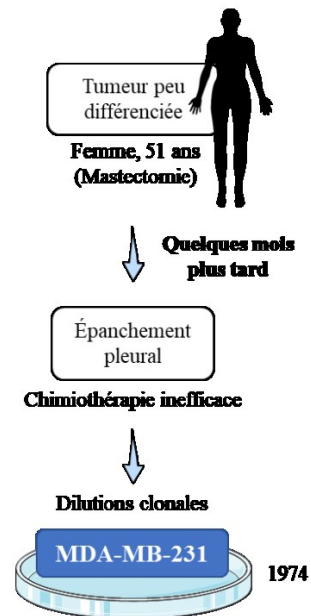


Figure 28 : Présentation de la lignée humaine MDA-MB-231.

À gauche, le schéma illustrant l'élaboration du modèle cellulaire au cours des années. À droite, photographie des cellules utilisées dans le projet.

Fibroblastes NIH/3T3

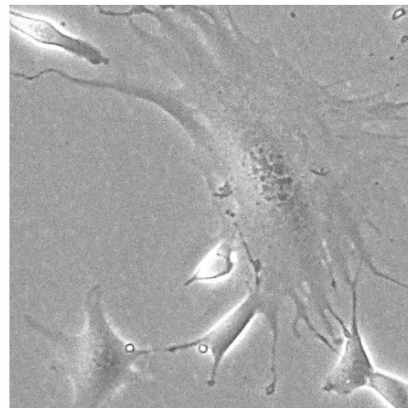
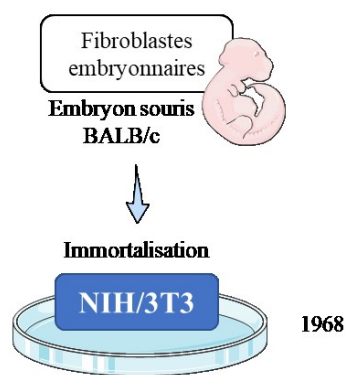


Figure 29 : Présentation de la lignée murine NIH/3T3.

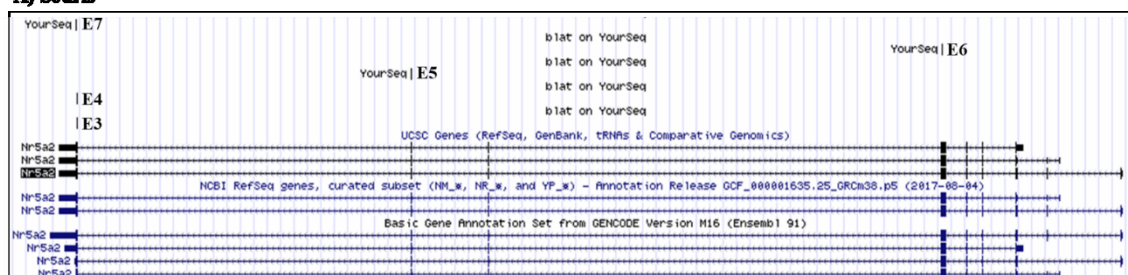
À gauche, le schéma illustrant l'élaboration du modèle cellulaire au cours des années. À droite, photographie des cellules utilisées dans le projet.

Annexe B – Informations complémentaires des ARN interférents

Tableau 1 : Liste des ARN interférents utilisés contre LRH-1 et leur séquence cible.

<i>Espèce</i>	<i>Appellation utilisée</i>	<i>Identité clonale</i>	<i>Séquence cible</i>
<i>Humaine</i>	G11	TRCN0000019656	GCGTTGTCCTTACTGTCGTTT
	G12	TRCN0000019657	GCTGGACTACACAATGTGTAA
<i>Murine</i>	E3	TRCN0000025966	GCAGAAGACTACCTGTACTAT
	E4	TRCN0000025985	CCCACAACAGACTGAGAAATT
	E5	TRCN0000026039	GCGGGAGTTTGTATGTCTCAA
	E6	TRCN0000025971	GCCTCAAGTTCAAGCGAAGAT
	E7	TRCN0000026050	CCCTATAATAACCTCCTCATT

A) Souris



B) Humain

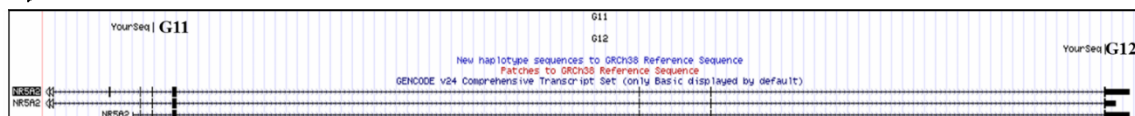


Figure 30 : Alignement des séquences des ARN interférents contre LRH-1.

Alignement des séquences des ARNsh murins (E3 à E7) sur les ARN connus (noir) ou prédits (bleu) de Nr5a2 (A) et des ARNsh humains (G11 et G12) sur les ARN connus de NR5A2 (B) provenant du site web *UCSC Genome Browser*.

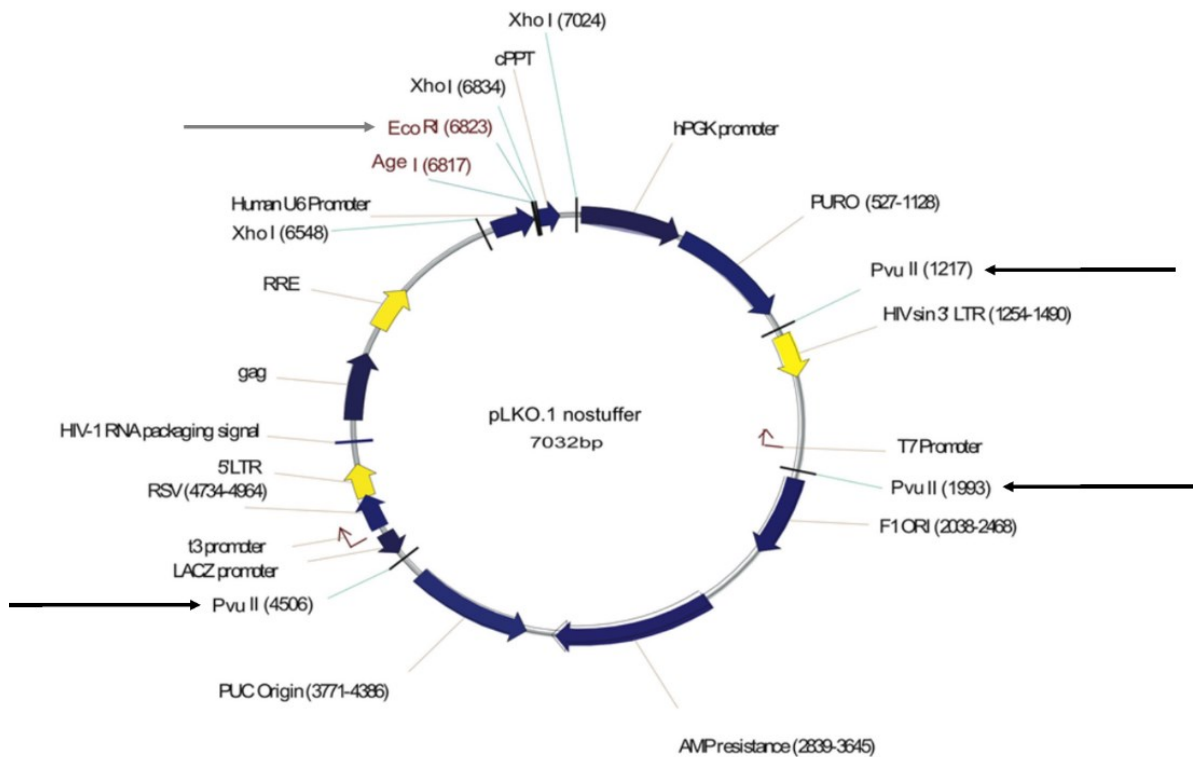


Figure 31 : Carte du plasmide pLKO.

Schéma modifié provenant d'*Addgene* (#10 878; <http://n2t.net/addgene:10878>). La flèche grise indique le site d'EcoRI et les flèches noires indiquent les sites de PvuII visés par la digestion enzymatique. La digestion par EcoRI devrait donner un fragment de 7032 kilobases (kb), alors que la digestion par PvuII devrait donner des fragments de 776, 2513 et 3743 kb.

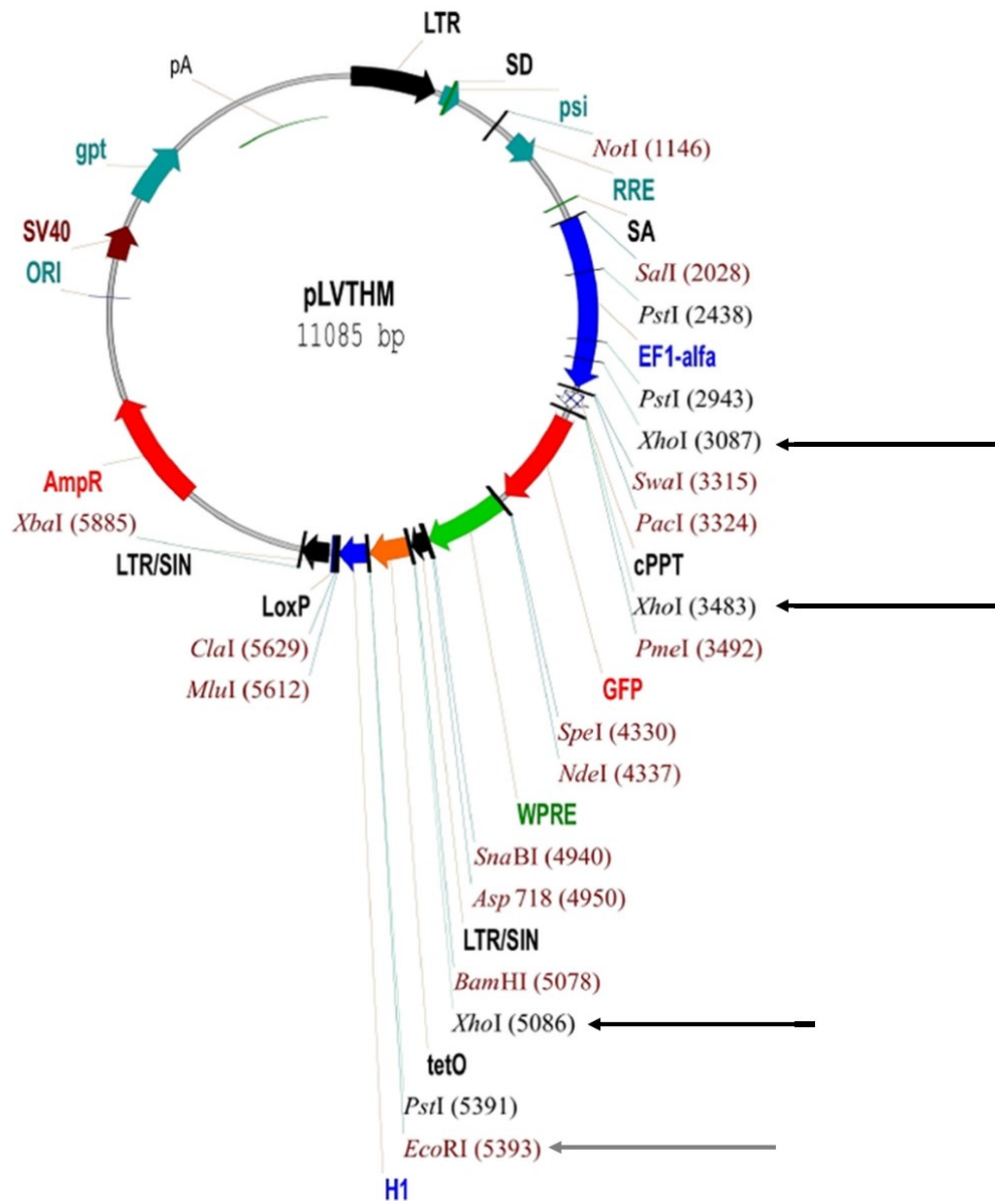


Figure 32 : Carte du plasmide pLVTHM.

Schéma modifié provenant d'Addgene (#12 247; <http://n2t.net/addgene:12247>). La flèche grise indique le site d'EcoRI et les flèches noires indiquent les sites de XhoI visés par la digestion enzymatique. La digestion par EcoRI devrait donner un seul fragment de 11 085 kb, alors que la digestion par XhoI devrait donner des fragments de 396, 1603 et 9086 kb.

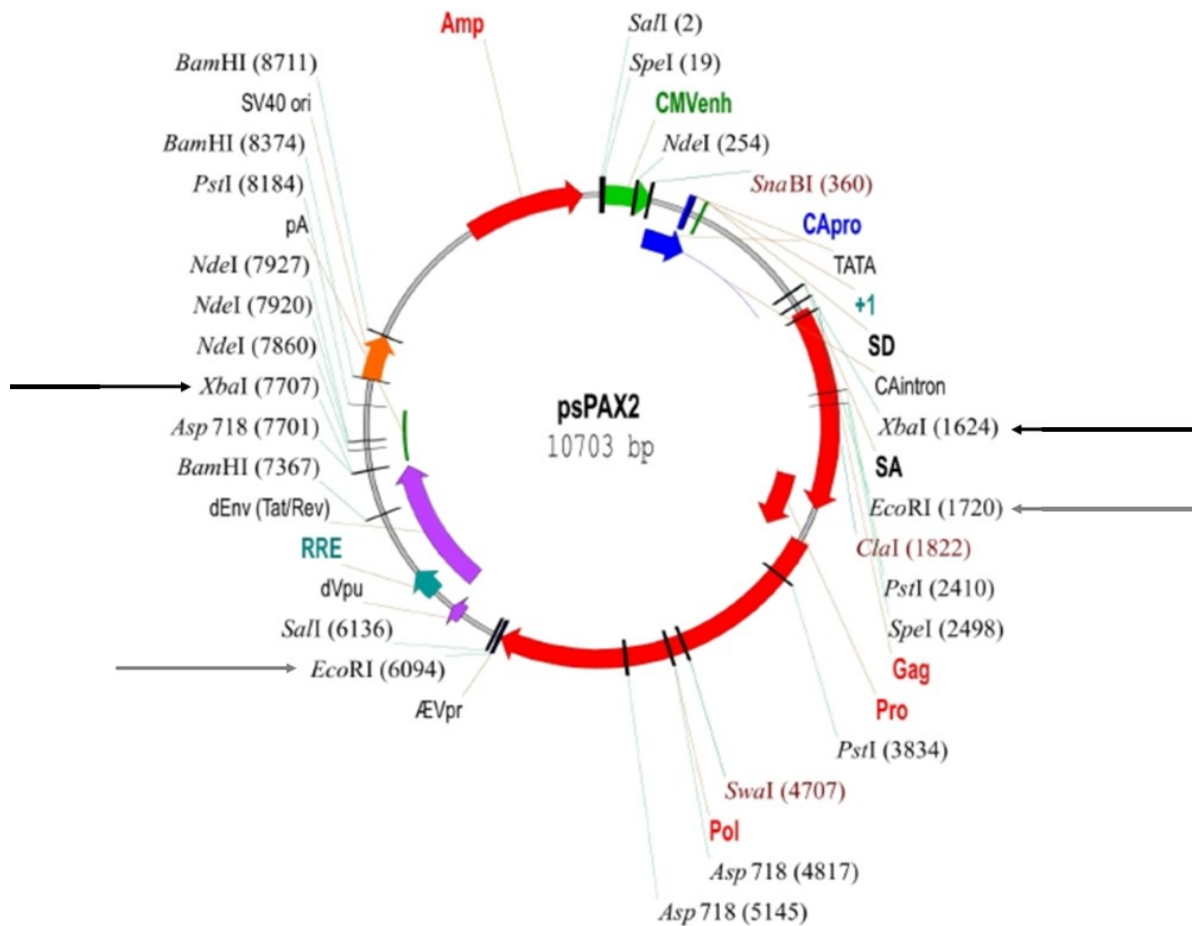


Figure 33 : Carte du plasmide pPAX2.

Schéma modifié provenant d'Addgene (#12 260; <http://n2t.net/addgene:12260>). Les flèches grises indiquent les sites d'EcoRI et les flèches noires indiquent les sites de XbaI visés par la digestion enzymatique. La digestion par EcoRI devrait donner des fragments de 6329 et 4374 kb, alors que la digestion par XbaI devrait donner des fragments de 6083 et 4620 kb.

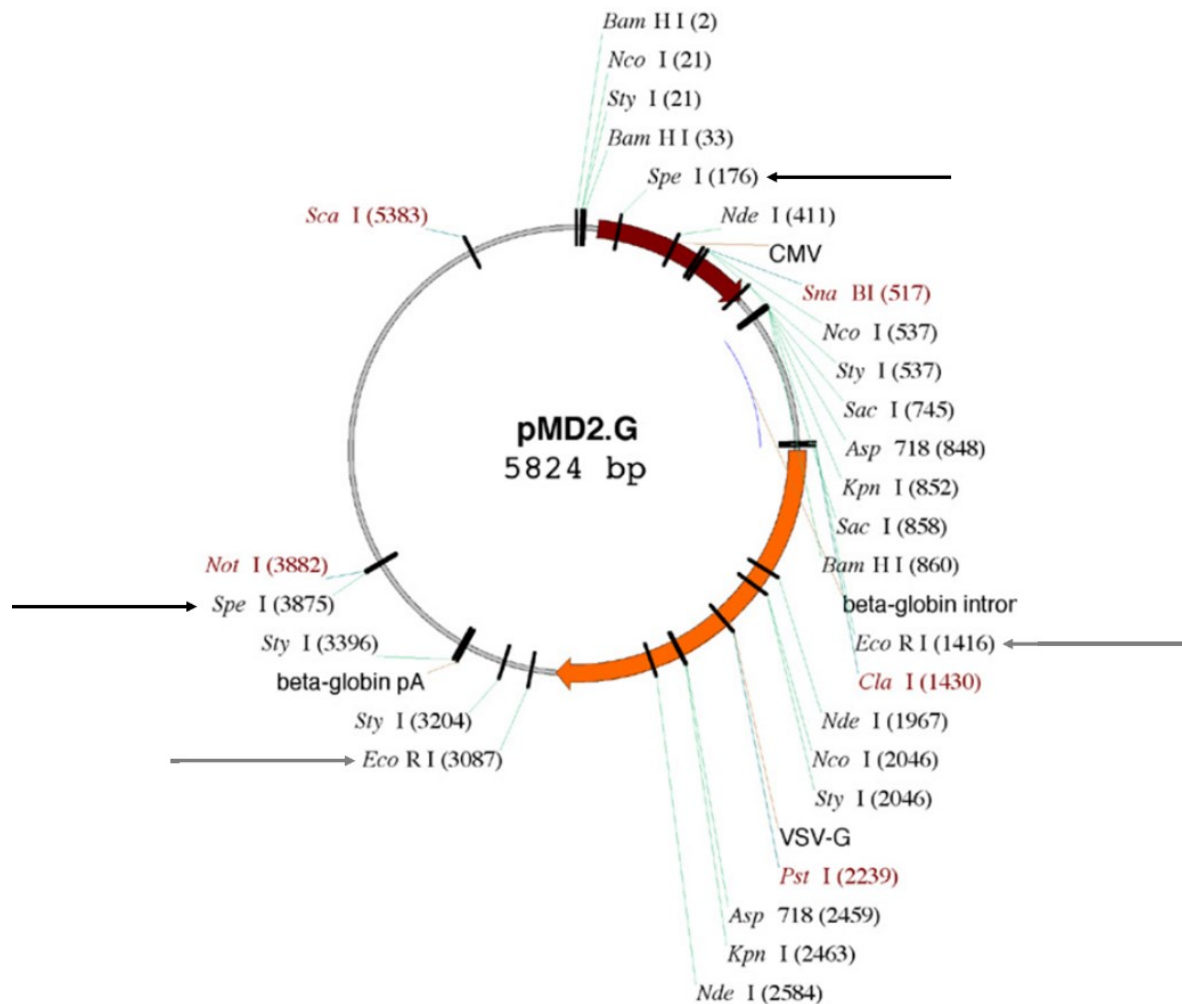


Figure 34 : Carte du plasmide pMD2G.

Schéma modifié provenant d'Addgene (#12 259; <http://n2t.net/addgene:12259>). Les flèches grises indiquent les sites d'EcoRI et les flèches noires indiquent les sites de SpeI visés par la digestion enzymatique. La digestion par EcoRI devrait donner des fragments de 4153 et 1671 kb, alors que la digestion par SpeI devrait donner des fragments de 3699 et 2125 kb.

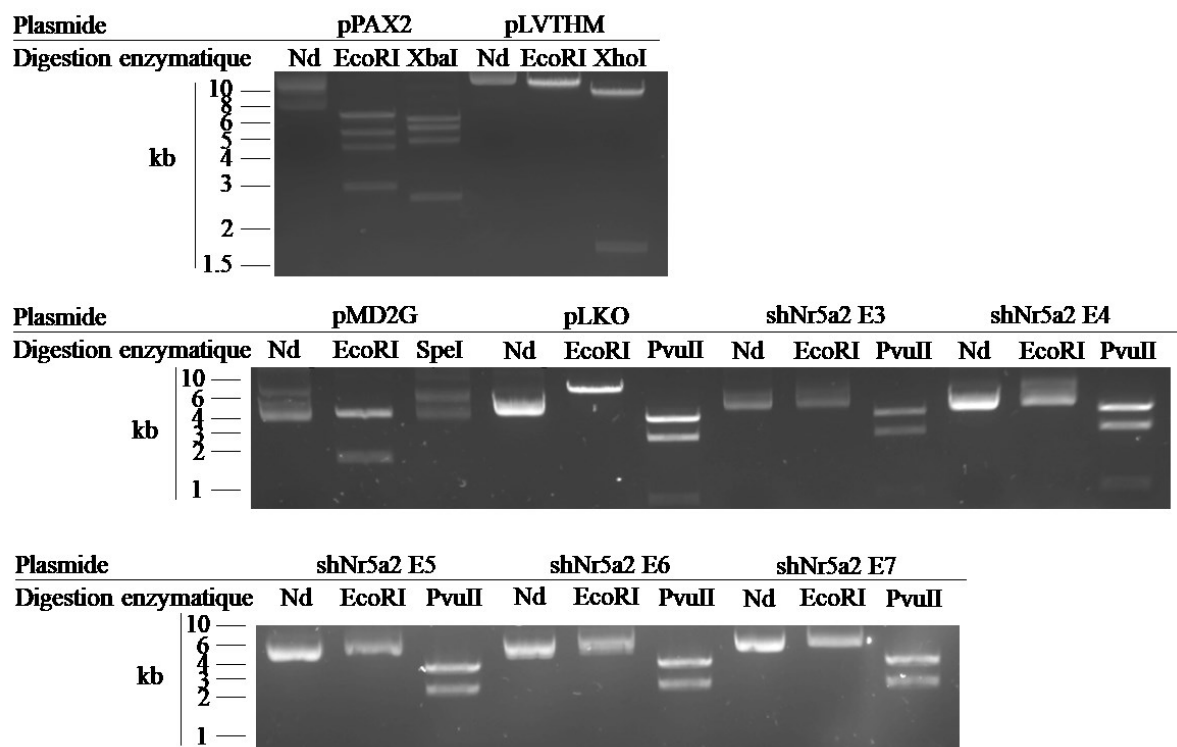


Figure 35 : Digestion enzymatique des plasmides pLKO, pLVTHM, pPAX2, pMD2G et les cinq candidats d'ARN interférents murins contre LRH-1.

Digestion enzymatique des différents plasmides utilisés pour la production de virus contenant les ARN interférents. La première partie a été effectuée ensemble et les deux autres proviennent du même gel. L'échelle est en kilobases (kb). Nd, non digéré.

ANNEXE C – Informations complémentaires des protocoles expérimentaux.

Tableau 2 : Composants détaillés pour la rétrotranscription (RT).

Composants	Quantités par puits (µL)
Tampon du MMLV (5 X)	5
MMLV	0,2
dNTP (10 nM)	1,25
Eau stérile	10,55
Total	17

µL, microlitres; nM, nanomoles; 5 X, concentré cinq fois; MMLV, enzyme transcriptase inverse; dNTP, nucléotides triphosphates.

Tableau 3 : Composants détaillés du mélange pour la réaction de polymérisation en chaîne quantitative (qPCR).

Composants	Quantités (µL)
Tampon de qPCR	249
dNTP (10 nM)	24,9
Taq it	1,556
Eau stérile	656,12
DMSO (50 %)	37,34
Sybr (10 X)	31,34
Total	1 mL

mL, millilitres; µL, microlitres; %, pourcentage; 10 X, concentré dix fois; dNTP, nucléotides triphosphates, DMSO, diméthylsulfoxyde.

Tableau 4 : Liste des amorces humaines utilisées pour le qPCR.

Gène cible	Sens	Amorce
CCND1	F	GCTGTGCATCTACACCGACA
	R	CCACTTGAGCTTGTTACCA
CDKN1A	F	GACTCTCAGGGTCGAAAACG
	R	GGCGTTTGGAGTGGTAGAAA
HPRT	F	TCCTTGGTCAGGCAGTATAAT
	R	GTCAAGGGCATATCCTACAAC
MYC	F	TTCGGGTAGTGGAAAACCAG
	R	CACCGAGTCGTAGTCGAGGT
NR5A2	F	GGGTACCATTATGGGCTCCT
	R	TGTCAATTTGGCAGTTCTGG
RPLP0	F	GCGACCTGGAAGTCCAATA
	R	ATCTGCTGCATCTGCTTGG
RPS28	F	CGATCCATCATCCGCAATG
	R	AGCCAAGCTCAGCGCAAC
TBP	F	CCGGCTGTTTAACTTCGCTT
	R	TTTTCCTAGAGCATCTCCAGC
VEGFA	F	CCTTGCTGCTCTACCTCCAC
	R	ATGATTCTGCCCTCCTCCTT

F, amorce sens; R, amorce anti-sens.

Tableau 5 : Liste des amorces murines utilisées pour le qPCR.

Gène cible	Sens	Amorce
Actb	F	CCAACCGTGAAAAGATGACC
	R	ACCAGAGGCATACAGGGCA
Ccnd1	F	TCAAGACGGAGGAGACCTGT
	R	GGAAGACCTCCTCTTCGCAC
Ccne1	F	CACTTTCTGCAGCGTCATCC
	R	AGTCCTGTGCCAAGTAGAACG
Ccng1	F	TTGGCTTTGACACGGAGACA
	R	CCCAAGATGCTTCGCCTGTA
Cdh1	F	GGCTTCAGTTCCGAGGTCTA
	R	GCCAGTGCATCCTTCAAATC
Cdh2	F	AAGGACAGCCCCTTCTCAAT
	R	CTGGCTCGCTGCTTTCATAC
Cdkn1a	F	CGGTGTCAGAGTCTAGGGGA
	R	AGGATTGGACATGGTGCCTG
Greb1	F	CTTCCAAGGAGGTCGGAGG
	R	GGGCTAGGTGCCAGGATCAA
Gusb	F	CGTTGCTCACAAAGGTCACG
	R	TCTGAAACCCGCCGCATATT
Mmp9	F	GCGTCATTTCGCGTGGATAAG
	R	TGGAAACTCACACGCCAGAA
Myc	F	TGGATTTCTTTTGGGCGTTG
	R	AATAGGGCTGTACGGAGTCG
Nr5a2	F	GCTCACTCCAGCAGTTTTGA
	R	GTTGAGTGGGCCAGGAGTAG
Rplp0	F	CGTCCTCGTTGGAGTGACAT
	R	TAGTTGGACTTCCAGGTCGC

Gène cible	Sens	Amorce
Rps18	F	ATCCCTGAAAAGTTCCAGCA
	R	CCCTCTTGGTGAGGTCAATG
Vegfa	F	CACGACAGAAGGAGAGCAGA
	R	AGATGTCCACCAGGGTCTCA
Vim	F	GTGGATCAGCTCACCAACG
	R	GCTTTCGGCTTCCTCTCTCT

F, amorce sens ; R, amorce anti-sens.

Tableau 6 : Solutions d'extraction protéique pour l'immunobuvardage

Composants	Tampon A	Tampon B
	Quantités (concentration)	Quantités (concentration)
HEPES pH 7,9 (1 M)	150 µL (10 mM)	200 µL (20 mM)
NaCl (5 M)	-	800 µL (0,4 M)
KCl (2 M)	50 µL (10 mM)	-
EDTA (0,5 M)	3 µL (0,1 mM)	20 µL (1 mM)
EGTA (0,25 M)	6 µL (0,1 mM)	40 µL (1 mM)
Eau stérile	15 mL	10 mL
Ajout au moment de l'extraction		
DTT (1 M)		1 µL/mL
PMSF (100 X)		10 µL/mL
Cocktail d'IP (100 X)		10 µL/mL

µL, microlitres; mL, millilitres; M, moles; mM, millimoles; 100 X, concentration cent fois; HEPES, 4-(2-hydroxyéthyl)-1-piperazineéthanesulfonique; NaCl, chlorure de sodium; KCl, chlorure de potassium; EDTA, acide éthylènediaminetetraacétique; EGTA, acide éthylèneglycol-bis-(amino-2-éthyléther)-N,N,N',N'-tétraacétique; DTT, dithiothreitol; PMSF, fluorure de phénylméthylsulfonyl; IP, inhibiteurs de phosphatase.

ANNEXE D – Sélection des ARN interférents pour la lignée murine D2A1.

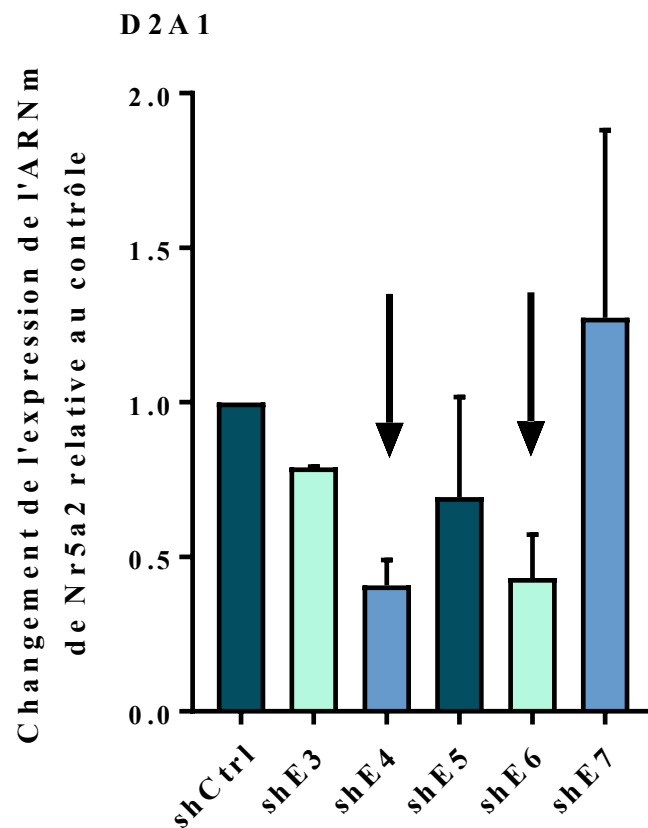


Figure 36 : Abondance relative de l'ARNm de LRH-1 des cellules cancéreuses murines D2A1 déplétées ou non pour LH-1 avec les cinq candidats d'ARN interférents.

N = 2.

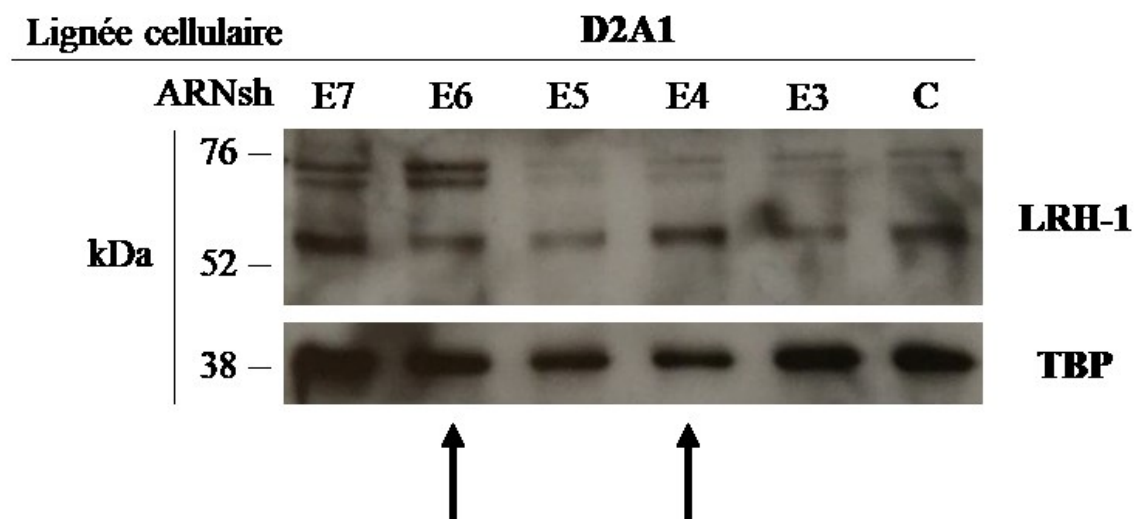


Figure 37 : Immunobuvardage contre LRH-1 des cellules cancéreuses murines D2A1 déplétées ou non pour LRH-1 avec les cinq candidats d'ARN interférents.

Échelle en kilodaltons (kDa).

BIBLIOGRAPHIE

- Aaronson, S.A. et Todaro, G.J. (1968). Development of 3T3-like lines from Balb-c mouse embryo cultures: transformation susceptibility to SV40. *J. Cell. Physiol.* 72, 141-148.
- Abbas, T. et Dutta, A. (2009). p21 in cancer: intricate networks and multiple activities. *Nat. Rev. Cancer* 9, 400-414.
- Abd El-Rehim, D.M., Ball, G., Pinder, S.E., Rakha, E., Paish, C. Robertson, J.F., Macmillan, D., Blamey, R.W. et Ellis, I.O. (2005). High-throughput protein expression analysis using tissue microarray technology of a large well-characterised series identifies biologically distinct classes of breast cancer confirming recent cDNA expression analyses. *Int. J. Cancer* 116, 340-350.
- Abdalla, M., Goc, A., Segar, L. et Somanath, P.R. (2013). Akt1 mediates α -smooth muscle actin expression and myofibroblast differentiation via myocardin and serum response factor. *J. Biol. Chem.* 288, 33483-33493.
- Abnaof, K., Mallela, N., Walenda, G., Meurer, S.K., Seré, K., Lin, Q., Smeets, B., Hoffmann, K., Wagner, W., Zenke, M. et al. (2014). TGF- β stimulation in human and murine cells reveals commonly affected biological processes and pathways at transcription level. *BMC Syst. Biol.* 8, 55.
- Acerbi, I., Cassereau, L., Dean, I., Shi, Q., Au, A., Park, C., Chen, Y.Y., Liphardt, J., Hwang, E.S. et Weaver, V.M. (2015). Human breast cancer invasion and aggression correlates with ECM stiffening and immune cell infiltration. *Integr. Biol. (Camb)*. 7, 1120-1134.
- Aesoy, R., Clyne C.D. et Chand, A.L. (2015). Insights into orphan nuclear receptors as prognostic markers and novel therapeutic targets for breast cancer. *Front. Endocrinol.* 6, 115.
- Agrawal, N., Dasaradhi, P.V., Mohammed, A., Malhotra, P., Bhatnagar, R.K. et Mukherjee, S.K. (2003). RNA interference: biology, mechanism, and applications. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 67, 657-685.
- Ahlin, C., Lundgren, C., Embretsén-Varro, E., Jirstrom, K., Blomqvist, C. et Fjällskog, M. (2017). High expression of cyclin D1 is associated to high proliferation rate and increased risk of mortality in women with ER-positive but not in ER-negative breast cancers. *Breast Cancer Res. Treat.* 164, 667-678.
- Akhurst, R.J. (2002). TGF-beta antagonists: why suppress a tumor suppressor? *J. Clin. Invest.* 109, 1533-1536.
- Akhurst, R.J. et Derynck, R. (2001). TGF-beta signaling in cancer – a double-edged sword. *Trends Cell Biol.* 11, S44-S51.

- Àlvarez-Teijeiro, S., García-Inclán, C., Villaronga, M.À., Casado, P., Hermida-Prado, F., Granda-Díaz, R., Rodrigo, J.P., Calvo, F., Del-Río-Ibáñez, N., Gandarillas, A. et al. (2018). Factors secreted by cancer-associated fibroblasts that sustain cancer stem properties in head and neck squamous carcinoma cells as potential therapeutic targets. *Cancers* 10, pii : E334.
- Angelucci, C., Maulucci, G., Lama, G., Proietti, G., Colabianchi, A., Papi, M., Maiorana, A., De Spirito, M., Micera, A., Balzamino, O.B. et al. (2012). Epithelial-stromal interactions in human breast cancer: effects on adhesion, plasma membrane fluidity and migration speed and directness. *PLoS One* 7, e50804.
- Annicotte, J.S., Chavey, C., Servant, N., Teyssier, J., Bardin, A., Licznar, A., Badia, E., Pujol, P., Vignon, F., Maudelonde, T. et al. (2005). The nuclear receptor liver receptor homolog-1 is an estrogen receptor target gene. *Oncogene* 24, 8167-8175.
- Annicotte, J.S., Fayard, E., Swift, G.H., Selanger, L., Edlund, H., Tanaka, T., Kodama, T., Schooijans, K. et Auwerx, J. (2003). Pancreatic-duodenal homeobox 1 regulates expression of liver receptor homolog 1 during pancreas development. *Mol. Cell. Biol.* 23, 6713-6724.
- Aoyagi, Y., Oda, T., Kinoshita, T., Nakahashi, C., Hasebe, T., Ohkohchi, N. et Ochiai, A. (2004). Overexpression of TGF-beta by infiltrated granulocytes correlates with the expression of collagen mRNA in pancreatic cancer. *Br. J. Cancer* 91, 1316-1326.
- Arteaga, C.L., Hurd, S.D., Winnier, A.R., Johnson, M.D., Fendly, B.M. et Forbes, J.T. (1993). Anti-transforming growth factor (TGF)-beta antibodies inhibit breast cancer cell tumorigenicity and increase mouse spleen natural killer cell activity. Implications for a possible role of tumor cell/host TGF-beta interactions in human breast cancer progression. *J. Clin. Invest.* 92, 2569-2576.
- Aslakson, C.J. et Miller, F.R. (1992). Selective events in the metastatic process defined by analysis of the sequential dissemination of subpopulations of a mouse mammary tumor. *Cancer Res.* 52, 1399-1405.
- Augsten, M., Sjöberg, E., Frings, O., Vorrink, S.U., Frijhoff, J., Olsson, E., Borg, Å. et Östman, A. (2014). Cancer-associated fibroblasts expressing CXCL14 rely upon NOS1-derived nitric oxide signaling for their tumor-supporting properties. *Cancer Res.* 74, 2999-3010.
- Badve, S., Dabbs, D.J., Schnitt, S.J., Baehner, F.L., Decker, T., Eusebi, V., Fox, S.B., Ichihara, S., Jacquemier, J., Lakhani, S.R. et al. (2011). Basal-like and triple-negative breast cancers: a critical review with an emphasis on the implications for pathologists and oncologists. *Mod. Pathol.* 24, 157-167.
- Balkwill, F.R., Capasso, M. et Hagemann, T. (2012). The tumor microenvironment at a glance. *J. Cell Sci.* 125, 5591-5596.
- Barnes, D.M. et Gillette, C.E. (1998). Cyclin D1 in breast cancer. *Breast Cancer Res. Treat.* 52, 1-15.
- Bauer, K.R., Brown, M., Cress, R.D., Parise, C.A. et Caggiano, V. (2007). Descriptive analysis of estrogen receptor (ER)-negative, progesterone receptor (PR)-negative, and HER2-

- negative invasive breast cancer, the so-called triple-negative phenotype: a population-based study from the Carolina cancer registry. *Cancer* 109, 1721-1728.
- Bayrer, J.R., Mukkamala, S., Sablin, E.P., Webb, P. et Fletterick, R.J. (2015). Silencing LRH-1 in colon cancer cell lines impairs proliferation and alters gene expression programs. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 112, 2467-2472.
- Becker-André, M., André, E. et DeLarmarter, J.F. (1993). Identification of nuclear receptor mRNAs by RT-qPCR amplification of conserved zinc-finger motif sequences. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 194, 1371-1379.
- Benod, C., Vinogradova, M.V., Jouravel, N., Kim, G.E., Fletterick, R.J. et Sablin, E.P. (2011). Nuclear receptor liver receptor homolog 1 (LRH-1) regulates pancreatic cancer cell growth and proliferation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 108, 16927-16931.
- Bertucci, F., Finetti, P., Cervera, N., Esterni, B., Hermitte, F., Viens, P. et Birnbaum, D. (2008). How basal are triple-negative breast cancers?. *Int. J. Cancer* 123, 236-240.
- Bhowmick, N.A., Neilson, E.G. et Moses, H.L. (2004). Stromal fibroblasts in cancer initiation and progression. *Nature* 432, 332-337.
- Bianco, S., Bellefleur, A.M., Beaulieu, É., Beuparlant, C.J., Bertolin, K., Droit, A., Schoojans, K., Murphy, B.D. et Gévry, N. (2019). The ovulatory signal precipitates LRH-1 transcriptional switching mediated by differential chromatin accessibility. *Cell Rep.* 28, 2443-2454.
- Bianco, S., Brunelle, M., Jangal, M., Magnani, L. et Gévry, N. (2014a). LRH-1 governs vital transcriptional programs in endocrine-sensitive and –resistant breast cancer cells. *Cancer Res.* 74, 2015-2025.
- Bianco, S., Jangal, M., Garneau, M. et Gévry, N. (2014 b). LRH-1 controls proliferation in breast tumor cells by regulating CDKN1A gene expression. *Oncogene* 34, 1-10.
- Blobe, G.C., Schiemann, W.P. et Lodish, H.F. (2000). Role of transforming growth factor beta in human disease. *N. Engl. J. Med.* 342, 1350-1358.
- Blows, F.M., Driver, K.E., Schmidt, M.K., Brooks, A., van Leeuwen, F.E., Wesseling, J., Cheang, M.C., Gelmon, K., Nielsen, T.O., Blomqvist, C. et al. (2010). Subtyping of breast cancer by immunohistochemistry to investigate a relationship between subtype and short and long term survival: a collaborative analysis of data for 10,159 cases from 12 studies. *PLoS Med.* 7, e1000279.
- Bochet, L., Lehuédé, C., Dauvillier, S., Wang, Y.Y., Dirat, B., Laurent, V., Dray, C., Guet, R., Maridonneau-Parini, I., Le Gonidec, S. et al. (2013). Adipocyte-derived fibroblasts promote tumor progression and contribute to the desmoplastic reaction in breast cancer. *Cancer Res.* 73, 5657-5668.
- Boerboom, D., Pilon, N., Behdjani, R., Silversides, D.W. et Sirois, J. (2000). Expression and regulation of transcripts encoding two members of the NR5A nuclear receptor subfamily of

- orphan nuclear receptors, steroidogenic factor-1 and NR5A2, in equine ovarian cells during the ovulatory process. *Endocrinology* *141*, 4647-4656.
- Botrugno, O.A., Fayard, E., Annicotte, J.S., Haby, C., Brennan, T., Wendling, O., Tanaka, T. Kodama, T., Thomas, W., Auwerx, J. et al. (2004). Synergy between LRH-1 and beta-catenin induces G1 cyclin-mediated cell proliferation. *Mol. Cell* *15*, 499-509.
- Bouchard, G., Therriault, H., Geha, S., Bérubé-Lauzière, Y., Bujold, R., Saucier, C. et Paquette, B. (2016). Stimulation of triple negative breast cancer cell migration and metastases formation is prevented by chloroquine in a pre-irradiated mouse model. *BMC Cancer* *16*, 361.
- Bouchard, M.F., Taniguchi, H. et Viger, R.S. (2005). Protein kinase A-dependent synergism between GATA factors and the nuclear receptor, liver receptor homolog-1, regulates human aromatase (CYP19) PII promoter activity in breast cancer cells. *Endocrinology* *146*, 4905-4916.
- Bouvier. M. (1994). Récepteurs constitutivement actifs et agonisme inverse. *Médecine/Sciences* *10*, 1011-1012.
- Bray, F., Ferlay, J., Soerjomataram, I., Siegel, R.L., Torre, L.A. et Jemal, A. (2018). Global cancer statistics 2018 : GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA Cancer J. Clin.* *68*, 394-424.
- Brenton, J.D., Carey, L.A., Ahmed, A.A. et Caldas, C. (2005). Molecular classification and molecular forecasting of breast cancer: ready for clinical application? *J. Clin. Oncol.* *23*, 7350-7360.
- Broasdu, J., McCabe, J.R., Endrizzi, B., Thummel, C.S. et Woodard, C.T. (1999). The drosophila beta FTZ-F1 orphan nuclear receptor provides competence for stage-specific responses to the steroid hormone ecdysone. *Mol. Cell* *3*, 143-149.
- Bronzert, D.A., Pantazis, P., Antoniadis, H.N., Kasid, A., Davidson, N., Dickson, R.B. et Lippman, M.E. (1987). Synthesis and secretion of platelet-derived growth factor by human breast cancer cell lines. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* *84*, 5763-5767.
- Burris, T.P., Busby, S.A. et Griggin, P.R. (2013). Targeting orphan nuclear receptors for treatment of metabolic diseases and autoimmunity. *Chem. Biol.* *19*, 51-59.
- Busby, S., Nuhant, P., Cameron, M., Mercier, B.A., Hodder, P., Roush, W.R. et Griffin, P.R. (2010). Discovery of inverse agonists for the liver receptor homologue-1 (LRH-1; NR5A2). *PMID : 23 166 964* *1*, 1-55.
- Cailleau, R., Young, R., Olivé, M. et Reeves, W.J. Jr. (1974). Breast tumor cell lines from pleural effusions. *J. Natl. Cancer Inst.* *53*, 661-674.
- Calvo, F., Ege, N., Grande-Garcia, A., Hooper, S., Jenkins, R.P., Chaudhry, S.I., Harrington, K., Williamson, P., Moeendarbary, E., Charras, G. et al. (2013). Mechanotransduction and

- YAP-dependent matrix remodelling is required for the generation and maintenance of cancer-associated fibroblasts. *Nat. Cell Biol.* 15, 637-646.
- Canel, M., Serrels, A., Frame, M.C. et Brunton, V.G. (2013). E-cadherin-integrin crosstalk in cancer invasion and metastasis. *J. Cell Sci.* 126, 393-401.
- Carey, L.A., Perou, C.M., Livasy, C.A., Dressler, L.G., Cowan, D., Conway, K., Karaca, G., Troester, M.A., Tse, C.K., Edmiston, S. et al. (2006). Race, breast cancer subtypes, and survival in the Carolina breast cancer study. *JAMA* 295, 2492-2502.
- Carmeliet, P. (2005). VEGF as a key mediator of angiogenesis in cancer. *Oncology* 3, 4-10.
- Chand, A.L., Herridge, K.A., Thompson, E.W. et Clyne, C.D. (2010). The orphan nuclear receptor LRH-1 promotes breast cancer motility and invasion. *Endocr. Relat. Cancer* 17, 965-975.
- Chand, A.L., Wijayakumara, D., Knowler, K., Herridge, K.A., Howard, T.L., Lazarus, K.A. et Clyne, C.D. (2012). The orphan nuclear receptor LRH-1 and $Er\alpha$ activate GREB1 expression to induce breast cancer cell proliferation. *PLoS One* 7, e31593.
- Chang, H.Y., Chi, J.T., Dudoit, S., Bondre, C., van de Rijn, M., Botstein, D. et Brown, P.O. (2002). Diversity, topographic differentiation, and positional memory in human fibroblasts. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 99, 12877-12882.
- Chou, C.H., Chen, S.U. et Cheng, J.C. (2009). Radiation-induced interleukin-6 expression through MAPK/p38/NF-kappaB signaling pathway and the resultant antiapoptotic effect on endothelial cells through Mcl-1 expression with sIL6-Ralpha. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* 75, 1553-1561.
- Cirri, P. et Chiarugi, P. (2011). Cancer associated fibroblasts: the dark side of the coin. *Am. J. Cancer Res.* 1, 482-497.
- Clyne, C.D., Kovacic, A., Speed, C.J., Zhou, J., Pezzi, V. et Simpson, E.R. (2004). Regulation of aromatase expression by the nuclear receptor LRH-1 in adipose tissue. *Mol. Cell. Endocrinol.* 215, 39-44.
- Clyne, C.D., Speed, C.J., Zhou, J. et Simpson, E.R. (2002). Liver receptor homologue-1 (LRH-1) regulates expression of aromatase in preadipocytes. *J. Biol. Chem.* 277, 20591-20597.
- Cobo, I., Martinelli, P., Flández, M., Bakiri, L., Zhang, M., Carrillo-de-Santa-Pau, E., Jia, J., Sánchez-Arévalo Lobo, V.J., Magiás, D., Felipe, I. et al. (2018). Transcriptional regulation by NR5A2 links differentiation and inflammation in the pancreas. *Nature* 554, 533-537.
- Coffey, R.J.Jr., Bascom, C. C., Sipes, N.J., Graves-Deal, R., Weissman, B.E. et Moses, H.L. (1988). Selective inhibition of growth-related gene expression in murine keratinocytes by transforming growth factor beta. *Mol. Cell. Biol.* 8, 3088-3093.
- Costa, A., Kieffer, Y., Scholer-Dahirel, A., Pelon, F., Bourachot, B., Cardon, M., Sirven, P., Magagna, I., Fuhrmann, L., Bernard, C. et al. (2018). Fibroblast heterogeneity and immunosuppressive environment in human breast cancer. *Cancer Cell* 33, 463-479.

- Coste, A., Dubugoy, L., Barnouin, R., Annicotte, J.S., Magnier, B., Notti, M., Corazza, N., Antal, M.C., Metzger, D., Desreumaux, P. et al. (2007). LRH-1-mediated glucocorticoid synthesis in enterocytes protects against inflammatory bowel disease. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* *104*, 13098-13103.
- Cui, W., Fowles, D.J., Bryson, S., Duffie, E., Ireland, H., Balmain, A. et Akhurst, R.J. (1996). TGF β 1 inhibits the formation of benign skin tumors, but enhances progression to invasive spindle carcinomas in transgenic mice. *Cell* *86*, 531-542.
- de Ronde, J.J., Hannemann, J., Halfwerk, H., Mulder, L., Straver, M.E., Vrancken Peeters, M.J., Wesseling, J., van de Vijver, M., Wessels, L.F., Rodenhuis, S. (2010). Concordance of clinical and molecular breast cancer subtyping in the context of preoperative chemotherapy response. *Breast Cancer Res. Treat.* *119*, 119-126.
- Desclozeaux, M., Krylova, I.N., Horn, F., Fletterick, R.J. et Ingraham, H.A. (2002). Phosphorylation and intramolecular stabilization of the ligand binding domain in the nuclear receptor steroidogenic factor 1. *Mol. Cell. Biol.* *22*, 7193-7203.
- Desmoulière, A., Geinoz, A., Gabbiani, F. et Gabbiani, G. (1993). Transforming growth factor-beta 1 induces alpha-smooth muscle actin expression in granulation tissue myofibroblasts and in quiescent and growing cultured fibroblasts. *J. Cell Biol.* *122*, 103-111.
- Dexter, D.L., Howalski, H.M., Blazar, B.A., Fligiel, Z., Vogel, R. et Heppner, G.H. (1978). Heterogeneity of tumor cells from a single mouse mammary tumor. *Cancer Res.* *38*, 3174-3181.
- Diallo-Danebrock, R., Ting, E., Gluz, O., Herr, A., Mohrmann, S., Geddert, H., Rody, A., Schaefer, K.L., Baldus, S.E., Hartmann, A. et al. (2007). Protein expression profiling in high-risk breast cancer patients treated with high-dose or conventional dose-dense chemotherapy. *Clin. Cancer Res.* *13*, 488-497.
- Doan, T.B., Graham, J.D. et Clarke, C.L. (2017). Emerging functional roles of nuclear receptors in breast cancer. *J. Mol. Endocrinol.* *58*, R169-R190.
- Duggavathi, R., Volle, D.H., Matak, C., Antal, M.C., Messadeg, N., Auwerx, J., Murphy, B.D. et Schoonjans, K. (2008). Liver receptor homolog 1 is essential for ovulation. *Genes Dev.* *22*, 1871-1876.
- Egeblad, M., Rasch, M.G. et Weaver, V.M. (2010). Dynamic interplay between the collagen scaffold and tumor evolution. *Curr. Opin. Cell Biol.* *22*, 697-706.
- Elenbaas, B. et Weinberg, R.A. (2001). Heterotypic signaling between epithelial tumor cells and fibroblasts in carcinoma formation. *Exp. Cell Res.* *264*, 169-184.
- Falender, A.E., Lanz, R., Malenfant, D., Belanger, L. et Richards, J.S. (2003). Differential expression of steroidogenic factor-1 and FTF/LRH-1 in the rodent ovary. *Endocrinology* *144*, 3598-3610.

- Fayard, E., Auwerx, J. et Schoonjans, K. (2004). LRH-1 : an orphan nuclear receptor involved in development, metabolism and steroidogenesis. *Trends Cell Biol.* *14*, 250-260.
- Felker, P., Seré, K., Lin, Q., Becker, C., Hristov, M., Hieronymus, T. et Zenke, M. (2010). TGF-beta1 accelerated dendritic cell differentiation from common dendritic cell progenitors and directs subset specification toward conventional dendritic cells. *J. Immunol.* *185*, 5326-5335.
- Fernandez-Marcos, P.J., Auwerx, J. et Schoonjans, K. (2011). Emerging actions of the nuclear receptor LRH-1 in the gut. *Biochim. Biophys. Acta.* *1812*, 947-955.
- Ferlay, J., Soergomatarum, I., Dikshit, R., Eser, S., Mathers, C., Rebelo, M., Parkin D.M., Forman, D. et Bray, F. (2015). Cancer incidence and mortality worldwide: sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012. *Int. J. Cancer* *136*, E359-E386.
- Folkman, J., Klagsbrun, M., Sasse, J., Wadzinski, M., Ingber, D. et Vlodavsky, I. (1988). A heparin-binding angiogenic protein – basic fibroblast growth factor – is stored within basement membrane. *Am. J. Pathol.* *130*, 393-400.
- Forsberg, K., Valyi-Nagy, I., Heldin, C.H., Herlyn, M. et Westermark, B. (1993). Platelet-derived growth factor (PDGF) in oncogenesis: development of a vascular connective tissue stroma in xenotransplanted human melanoma producing PDGF-BB. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* *90*, 393-397.
- Foulkes, W.D., Metcalfe, K., Sun, P., Hanna, W.M., Lynch, H.T., Ghadirian, P., Tung, N., Olopade, O.I., Weber, B.L., McLennan, J. et al. (2004). Estrogen receptor status in BRCA1- and BRCA2-related breast cancer: the influence of age, grade, and histological type. *Clin. Cancer Res.* *10*, 2029-2034.
- Foulkes, W.D., Smith, I.E. et Reis-Filho, J.S. (2010). Triple-negative breast cancer. *N. Engl. J. Med.* *363*, 1938-1948.
- Fountzilas, G., Dafni, U., Bobos, M., Batistatou, A., Kotoula, V., Trihia, H., Malamou-Mitsi, V., Miliaras, S., Chrisafi, S., Papadopoulos, S. et al. (2012). Differential response of immunohistochemically defined breast cancer subtypes to anthracycline-based adjuvant chemotherapy with or without paclitaxel. *PLoS One* *7*, e37946.
- Francis, G.A., Fayard, E., Picard, F. et Auwerx, J. (2003). Nuclear receptors and the control of metabolism. *Annual Review of Physiology*, *65*, 261-311.
- Freed-Pastor, W.A. et Prives, C. (2012). Mutant p53 : one name, many proteins. *Genes Dev.* *26*, 1268-1286.
- Gabbiani, G. (2003). The myofibroblast in wound healing and fibrocontractive diseases. *J. Pathol.* *200*, 500-503.
- Gaggioli, C., Hooper, S., Hidalgo-Carcedo, C., Grosse, R., Marshall, J.F., Harrington, K. et Sahai, E. (2007). Fibroblast-led collective invasion of carcinoma cells with differing roles for RhoGTPases in leading and following cells. *Nat. Cell Biol.* *9*, 1392-1400.

- Galarneau, L., Drouin, R. et Bélanger, L. (1998). Assignment of the fetoprotein transcription factor gene (FTF) to human chromosome band 1q32.11 by in situ hybridization. *Cytogenet. Cell Genet.* 82, 269-270.
- Galarneau, L., Paré, J.F., Allard, D., Hamel, D., Levesque, L., Tugwood, J.D., Green, S. et Bélanger, L. (1996). The alpha1-fetoprotein locus is activated by a nuclear receptor of the drosophila FTZ-F1 family. *Mol. Cell. Biol.* 16, 3853-3865.
- Gascard, P. et Tlsty, T.D. (2016). Carcinoma-associated fibroblasts: orchestrating the composition of malignancy. *Genes Dev.* 30, 1002-1019.
- Giannoni, E., Bianchini, F., Masieri, L., Serni, S., Torre, E., Calorini, L. et Chiarugi, P. (2010). Reciprocal activation of prostate cancer cells and cancer-associated fibroblasts stimulates epithelial-mesenchymal transition and cancer stemness. *Cancer Res.* 70, 6945-6956.
- Giguère, V., Hollenberg, S.M., Rosenfeld, M.G. et Evans, R.M. (1986). Functional domains of the human glucocorticoid receptor. *Cell* 46, 645-652.
- Goc, A., Choudhary, M., Byzova, T.V. et Somanath, P.R. (2011). TGF β - and bleomycin-induced extracellular matrix synthesis is mediated through Akt and mammalian target of rapamycin (mTOR). *J. Cell. Physiol.* 226, 3004-3013.
- Gold, L.I. (1999). The role for transforming growth factor-beta (TGF-beta) in human cancer. *Crit. Rev. Oncog.* 10, 303-360.
- Gomes, F.G., Nedel, F., Alves, A.M., Nör, J.E. et Tarquinio, S.B. (2013). Tumor angiogenesis and lymphangiogenesis: tumor/endothelial crosstalk and cellular/microenvironmental signaling mechanisms. *Life Sci.* 92, 101-107.
- Gorsch, S.M., Memoli, V.A., Stukel, T.A., Gold, L.I. et Arrick, B.A. (1992). Immunohistochemical staining for transforming growth factor beta 1 associates with disease progression in human breast cancer. *Cancer Res.* 52, 6942-6952.
- Grgurevic, N., Tobet, S. et Majdic, G. (2005). Widespread expression of liver receptor homolog 1 in mouse brain. *Neuro Endocrinol. Lett.* 26, 541-547.
- Gronemeyer, H., Gustafsson, J.A. et Laudet, V. (2004). Principles for modulation of the nuclear receptor superfamily. *Nat. Rev. Drug Discov.* 3, 950-964.
- Hazan, R.B., Phillips, G.R., Qiao, R.F., Norton, L. et Aaronson, S.A. (2000). Exogenous expression of N-cadherin in breast cancer cells induces cell migration, invasion, and metastasis. *J. Cell Biol.* 148, 779-790.
- Heppner, G.H., Dexter, D.L., DeNucci, T., Miller, F.R. et Calabresi, P. (1978). Heterogeneity in drug sensitivity among tumor cell subpopulations of a single mammary tumor. *Cancer Res.* 38, 3758-3763.
- Herschkowitz, J.I., Simin, K., Weigman, V.J., Mikaelian, I., Usary, J., Hu, Z., Rasmussen, K.E., Jones, L.P., Assefnia, S., Chandrasekharan, S. et al. (2007). Identification of conserved

- expression features between murine mammary carcinoma models and human breast tumors. *Genome Biol.* 8, R76.
- Hinshelwood, M.M., Repa, J.J., Shelton, J.M., Richardson, J.A., Mangelsdorf, D.J. et Mendelson, C.R. (2003). Expression of LRH-1 and SF-1 in the mouse ovary: localization in different cell types correlates with differing function. *Mol. Cell. Endocrinol.* 207, 39-45.
- Hu, Z., Fan, C., Oh, D.S., Marron, J.S., He, X., Qagish, B.F., Livasy, C., Carey, L.A., Reynolds, E., Dressler, L. et al. (2006). The molecular portraits of breast tumors are conserved across microarray platforms. *BMC Genomics* 7.
- Huang, S.C., Lee, C.T. et Chung, B.C. (2014). Tumor necrosis factor suppresses NR5A2 activity and intestinal glucocorticoid synthesis to sustain chronic colitis. *Sci. Signal.* 7, ra20.
- Ingraham, H. et Redinbo, M. (2005). Orphan nuclear receptors adopted by crystallography. *Curr. Opin. Struct. Biol.* 15, 708-715.
- Irvin, W.J. et Carey, L.A. (2008). What is triple-negative breast cancer?. *Eur. J. Cancer* 44, 2799-2805.
- Ishii, G., Hashimoto, H., Asada, K., Ito, T., Hoshino, A., Fujii, S., Kojima, M., Kuwata, T., Harigaya, K., Nagai, K., et al. (2010). Fibroblasts associated with cancer cells keep enhanced migration activity after separation from cancer cells: A novel character of tumor educated fibroblasts. *Int. J. Oncol.* 37, 317-325.
- Kalluri, R. (2016). The biology and function of fibroblasts in cancer. *Nat. Rev. Cancer* 16, 582-598.
- Kalluri, R. et Zeisberg, M. (2006). Fibroblasts in cancer. *Nat. Rev. Cancer* 6, 392-401.
- Katoh, M. (2019). Fibroblast growth factor receptors as treatment targets in clinical oncology. *Nat. Rev. Clin. Oncol.* 16, 105-122.
- Kerlikowske, K. (2010). Epidemiology of ductal carcinoma in situ. *J. Natl. Cancer Inst. Monogr.* 2010, 139-141.
- Kim, J.W., Peng, N., Rainey, W.E., Carr, B.R. et Attia, G.R. (2004). Liver receptor homolog-1 regulates the expression of steroidogenic acute regulatory protein in human granulosa cells. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 89, 3042-3047.
- Kordon, E.C., Guerra, F., Molinolo, A.A., Elizalde, P., Charreau, E.H., Pasqualini, C.D., Montecchia, F., Pazos, P., Dran, G. et Lanari, C. (1994). Effect of sialoadenectomy on medroxyprogesterone-acetate-induced mammary carcinogenesis in BALB/c mice. Correlation between histology and epidermal-growth-factor receptor content. *Int. J. Cancer* 59, 196-203.
- Kreike, B., van Kouwenhove, M., Horlings, H., Weigelt, B., Peterse, H., Bartelink, H. et van de Vijver, M.J. (2007). Gene expression profiling and histopathological characterization of triple-negative/basal-like breast carcinomas. *Breast Cancer Res.* 9, R65.

- Krylova, I.N., Sablin, E.P., Moore, J., Xu, R.X., Waitt, G.M., MacKay, J.A., Juzumiene, D., Bynum, J.M., Madauss, K., Montana, V. et al. (2005). Structural analyses reveal phosphatidyl inositols as ligands for the NR5 orphan receptors SF-1 and LRH-1. *Cell* 120, 343-355.
- Kumar, V., Green, S., Stack, G., Berry, M., Jin, J.R. et Chambon, P. (1987). Functional domains of the human estrogen receptor. *Cell* 51, 941-951.
- Lam, S.W., Jimenez, C. R. et Boven, E. (2014). Breast cancer classification by proteomic technologies: current state of knowledge. *Cancer Treat. Rev.* 40, 129-138.
- Lamprecht M.R., Sabatini D.M., Carpenter A.E. (2007) CellProfiler : free, versatile software for automated biological image analysis. *Biotechniques* 42, 71-75.
- Lanari, C., Lüthy, I., Lamb, C.A., Fabris, V., Pagano, E., Helguero, L.A., Sanjuan, N., Merani, S. et Molinolo, A.A. (2001). Five novel hormone-responsive cell lines derived from murine mammary ductal carcinomas: in vivo and in vitro effects of estrogens and progestins. *Cancer Res.* 61, 293-302.
- Lanari, C., Molinolo, A.A. et Pasqualini, C.D. (1986). Induction of mammary adenocarcinomas by medroxyprogesterone acetate in BALB/c female mice. *Cancer Lett.* 33, 215-223.
- Lavorgna, G., Ueada, H., Clos, J. et Wu, C. (1991). FTZ-F1, a steroid hormone receptor-like protein implicated in the activation of fushi tarazu. *Science* 252, 848-851.
- Lazarus, K.A., Wijayakumara, D., Chand, A.L., Simpson, E.R. et Clyne C.D. (2012). Therapeutic potential of liver receptor homolog-1 modulators. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 130, 138-146.
- Leavitt, J., Gunning, P., Kedes, L. et Jariwalla, R. (1985). Smooth muscle alpha-action is a transformation-sensitive marker for mouse HIH 3T3 and Rat-2 cells. *Nature* 316, 840-842.
- Lee, S.W., Kwak, H.S., Kang, M.H., Park, Y.Y. et Jeong, G.S. (2018). Fibroblast-associated tumor microenvironment induces vascular structure-networked tumouroid. *Sci. Rep.* 8, 2365.
- Lee, Y.K. et Moore, D.D. (2008). Liver receptor homolog-1, an emerging metabolic modulator. *Front. Biosci.* 13, 5950-5958.
- Lefèvre, L., Authier, H., Stein, S., Majorel, C., Couderc, B., Dardenne, C., Eddine, M.A., Meunier, E., Bernad, J., Valentin, A. et al. (2015). LRH-1 mediates anti-inflammatory and antifungal phenotype of IL-13-activated macrophages through the PPAR γ ligand synthesis. *Nat. Commun.* 6, 6801.
- Lieubeau, B., Garrigue, L., Barbieux, I., Meglah, K. et Gregoire, M. (1994). The role of transforming growth factor beta 1 in the fibroblastic reaction associated with rat colorectal tumor development. *Cancer Res.* 54, 6526-6532.
- Li, M., Xie, Y.H., Kong, Y.Y., Wu, Z., Zhu, L. et Wang, Y. (1998). Cloning and characterization of a novel human hepatocyte transcription factor, hB1F, which binds and activates enhancer II of hepatitis B virus. *J. Biol. Chem.* 273, 29022-29031.

- Li, X., Xu, Q., Wu, Y., Li, J., Tang, D., Han, L. et Fan, Q. (2014). A CCL2/ROS autoregulation loop is critical for cancer-associated fibroblasts-enhanced tumor growth of oral squamous cell carcinoma. *Carcinogenesis* 35, 1362-1370.
- Lin, Q., Aihara, A., Chung, W., Li, Y., Chen, X., Huang, Z., Weng, S., Carlson, R.I., Nadolny, C., Wands, J.R. et al. (2014a). LRH1 promotes pancreatic cancer metastasis. *Cancer Lett.* 350, 15-24.
- Lin, Q., Aihara, A., Chung, W., Li, Y., Huang, Z., Chen, X., Weng, S., Carlson, R.I., Wands, J.R. et Dong, X. (2014b). LRH1 as a driving factor in pancreatic cancer growth. *Cancer Lett.* 345, 85-90.
- Liu, D.L., Liu, W.Z., Li, Q.L., Wang, H.M., Qian, D., Treuter, E. et Zhu, C. (2003). Expression and functional analysis of liver receptor homologue 1 as a potential steroidogenic factor in rat ovary. *Biol. Reprod.* 69, 508-517.
- Löhr, M., Schmidt, C., Ringel, J., Kluth, M., Müller, P., Nizze, H. et Jesnowski, R. (2001). Transforming growth factor-beta1 induces desmoplasia in an experimental model of human pancreatic carcinoma. *Cancer Res.* 61, 550-555.
- Lu, P., Weaver, V.M. et Werb, Z. (2012). The extracellular matrix: a dynamic niche in cancer progression. *J. Cell Biol.* 196, 395-406.
- Luker, K.E., Lewin, S.A., Mihalko, L.A., Schmidt, B.T., Winkler, J.S., Coggins, N.L., Thomas, D.G. et Luker, G.D. (2012). Scavenging of CXCL12 by CXCR7 promotes tumor growth and metastasis of CXCR4-positive breast cancer cells. *Oncogene* 31, 4750-4758.
- Luo, X., Ikeda, Y. et Parker, K.L. (1994). A cell-specific nuclear receptor is essential for adrenal and gonadal development and sexual differentiation. *Cell* 77, 481-490.
- Mangelsdorf, D.J., Thummel, C., Beato, M., Herrlich, P., Schütz, G., Umesono, K., Blumberg, B., Kastner, P., Mark, M., Chambon, P. et al. (1995). The nuclear receptor superfamily: the second decade. *Cell* 83, 835-839.
- Medina, D. (1973). Preneoplastic lesions in mouse mammary tumorigenesis. *Meth. Cancer Res.* 7, 3-53.
- Meinsohn, M.C., Smith, O.E., Bertolin, K. et Murphy, B.D. (2019). The orphan nuclear receptors steroidogenic factor-1 and liver receptor homolog-1: structure, regulation, and essential roles in mammalian reproduction. *Physiol. Rev.* 99, 1249-1279.
- Mi, Z., Bhattacharya, S.D., Kim, V.M., Guo, H., Talbot, L.J. et Kuo, P.C. (2011). Osteopontin promotes CCL-mesenchymal stromal cell-mediated breast cancer metastasis. *Carcinogenesis* 32, 477-487.
- Miki, Y., Clyne, C.D., Suzuki, T., Moriya, T., Shibuya, R., Nakamura, Y., Ishida, T., Yabuki, N., Kitada, K., Hayashi, S. et al. (2006). Immunolocalization of liver receptor homologue-1 (LRH-1) in human breast carcinoma: possible regulator of in situ steroidogenesis. *Cancer Lett.* 244, 24-33.

- Miki, Y., Suzuki, T., Tazawa, C., Yamaguchi, Y., Kitada, K., Honma, S., Moriya, T., Hirakawa, H., Evans, D.B., Hayashi, S. et al. (2007). Aromatase localization in human breast cancer tissues: possible interactions between intratumoral stromal and parenchymal cells. *Cancer Res.* *67*, 3945-3954.
- Millard, C.J., Watson, P.J., Fairall, L. et Schwabe, J.W. (2013). An evolving understanding of nuclear receptor coregulator proteins. *J. Mol. Endocrinol.* *51*, T23-T36.
- Miller, F.R., Miller, B.E. et Heppner, G.H. (1983). Characterization of metastatic heterogeneity among subpopulations of a single mouse mammary tumor: heterogeneity in phenotypic stability. *Invasion Metastasis* *3*, 22-31.
- Mittal, M., Siddiqui, M.R., Tran, K., Reddy, S.P. et Malik, A.B. (2014). Reactive oxygen species in inflammation and tissues injury. *Antioxid. Redox. Signal.* *20*, 1126-1167.
- Mrozik, K.M., Blaschuk, O.W., Cheong, C.M., Zannettino, A.C.W. et Vandyke, K. (2018). N-cadherin in cancer metastasis, its emerging role in haematological malignancies and potential as a therapeutic target in cancer. *BMC Cancer* *18*, 939.
- Murphy, G. et Nagase, H. (2008). Progress in matrix metalloproteinase research. *Mol. Aspects Med.* *29*, 290-308.
- Muscat, G.E., Eriksson, N.A., Byth, K., Loi, S., Graham, D., Jindal, S., Davis, M.J. Clyne, C., Funder, J.W., Simpson, E.R. et al. (2013). Research resource: nuclear receptors as transcriptome: discriminant and prognostic value in breast cancer. *Mol. Endocrinol.* *27*, 350-365.
- Nadolny, C. et Dong, X. (2015). Liver receptor homolog-1 (LRH-1) : a potential therapeutic target for cancer. *Cancer Biol. Ther.* *16*, 997-1004.
- Nagasaki, T., Hara, M., Nakanishi, H., Takahashi, H., Sato, M. et Takeyama, H. (2014). Interleukin-6 released by colon cancer-associated fibroblasts is critical for tumor angiogenesis: anti-inteleukin-6 receptor antibody suppressed angiogenesis and inhibited tumor-stroma interaction. *Br. J. Cancer* *110*, 469-478.
- Negmadjanov, U., Godic, Z., Rizvi, F., Emelyanova, L., Ross, G., Richards, J., Holmuhamedov, E.L. et Jahangir, A. (2015). TGF- β 1-mediated differentiation of fibroblasts is associated with increased mitochondrial content and cellular respiration. *PLoS One* *10*, e0123046.
- Neve, R.M., Chin, K., Fridlyand, J., Yeh, J., Baehner, F.L., Fevr, T., Clark, L., Bayani, N., Coppe, J.P., Tong, F. et al. (2006). A collection of breast cancer cell lines for the study of functionally distinct cancer subtypes. *Cancer Cell* *10*, 515-527.
- Nielsen, T.O., Hsu, F.D., Jensen, K., Cheang, M., Karaca, G., Hu, Z., Hernandez-Boussard, T., Livasy, C., Cowan, D. et al. (2004). Immunohistochemical and clinical characterization of the basal-like subtype of invasive breast carcinoma. *Clin. Cancer Res.* *10*, 5367-5374.

- Nitta, M., Ku, S., Brown, C., Okamoto, A.Y. et Shan, B. (1999). CPF: an orphan nuclear receptor that regulates liver-specific expression of the human cholesterol 7 α -hydroxylase gene. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* *96*, 6660-6665.
- O'Brien, K.M., Cole, S.R., Tse, C.K., Perou, C.M., Carey, L.A., Foulkes, W.D., Dressler, L.G., Geradts, J. et Millikan, R.C. (2010). Intrinsic breast tumor subtypes, race, and long-term survival in the Carolina breast cancer study. *Clin. Cancer. Res.* *16*, 6100-6110.
- Ortlund, E.A., Lee, Y., Solomon, I.H., Hager, J.M., Safi, R., Choi, Y., Guan, Z., Tripathy, A., Raetz, C. R., McDonnell, D.P. et al. (2005). Modulation of human nuclear receptor LRH-1 activity by phospholipids and SHP. *Nat. Struct. Mol. Biol.* *12*, 357-363.
- Östman, A. et Augsten, M. (2009). Cancer-associated fibroblasts and tumor growth – bystanders turning into key players. *Curr. Opin. Genet. Dev.* *19*, 67-73.
- Ozbek, S., Balasubramanian, P.G., Chiquet-Ehrismann, R., Tucker, R.P. et Adams, J.C. (2010). The evolution of extracellular matrix. *Mol. Biol. Cell* *21*, 4300-4305.
- Pang, J.B., Molania, R., Chand, A., Knowler, K., Takano, E.A., Byrne, D.J., Mikeska, T., Millar, E.K.A., Lee, C.S., O'Toole, S.A. et al. (2017). LRH-1 expression patterns in breast cancer tissues are associated with tumor aggressiveness. *Oncotarget* *8*, 83626-83636.
- Paquette, B., Therriault, H., Desmarais, G., Wagner, R., Royer, R. et Bujold, R. (2011). Radiation-enhancement of MDA-MB-231 breast cancer cell invasion prevented by a cyclooxygenase-2 inhibitor. *Br. J. Cancer* *105*, 534-541.
- Paré, J.F., Roy, S., Galarneau, L. et Bélanger, L. (2001). The mouse fetoprotein transcription factor (FTF) gene promoter is regulated by three GATA elements with tandem E box and Nkx motifs, and FTF in turn activates the Hnf3 β , Hnf4 α , and Hnf1 α gene promoters. *J. Biol. Chem.* *276*, 13136-13144.
- Parker, J.S., Mullins, M., Cheang, M.C., Leung, S., Voduc, D., Vickery, T., Davies, S., Fauron, C., He, X., Hu, Z. et al. (2009). Supervised risk predictor of breast cancer based on intrinsic subtypes. *J. Clin. Oncol.* *27*, 1160-1167.
- Parsonage, G., Filer, A.D., Haworth, O., Nash, G.B., Rainger, G.E., Salmon, M. et Buckley, C.D. (2005). A stromal address code defined by fibroblasts. *Trends Immunol.* *26*, 150-156.
- Perou, C.M., Sørlie, T., Eisen, M.B., van de Rijn, M., Jeffrey, S.S., Rees, C.A., Pollack, J.R., Ross, D.T., Johnsen, H., Akslen, L.A. et al. (2000). Molecular portraits of human breast tumours. *Nature* *406*, 747-752.
- Petersen, O.W., Nielsen, H.L., Gudjonsson, T., Villadsen, R., Rank, F., Niebuhr, E., Bissell, M.J. et Rønnov-Jessen, L. (2003). Epithelial to mesenchymal transition in human breast cancer can provide a non-malignant stroma. *Am. J. Pathol.* *162*, 391-402.
- Pickup, M.W., Mouw, J.K. et Weaver, V.M. (2014). The extracellular matrix modulates the hallmarks of cancer. *EMBO Rep.* *15*, 1243-1253.

- Prat, A. et Perou, C.M. (2011). Deconstructing the molecular portraits of breast cancer. *Mol. Oncol.* 5, 5-23.
- Radisky, D.C., Kenny, P.A. et Bissell, M.J. (2007). Fibrosis and cancer: do myofibroblasts come also from epithelial cells via EMT? *J. Cell. Biochem.* 101, 830-839.
- Rakha, E., Ellis, I. et Reis-Filho, J. (2008a). Are triple-negative and basal-like breast cancer synonymous? *Clin. Cancer Res.* 14, 618.
- Rakha, E.A., Reis-Filho, J.S. et Ellis, I.O. (2008 b). Basal-like breast cancer: a critical review. *J. Clin. Oncol.* 26, 2568-2581.
- Rausa, F.M., Galarneau, L., Bélanger, L. et Costa, R.H. (1999). The nuclear receptor fetoprotein transcription factor is coexpressed with its target gene HNF-3beta in the developing murine liver, intestine and pancreas. *Mech. Dev.* 89, 185-188.
- Reid, S.E., Kay, E.J., Neilson, L.J., Henze, A.T., Serneels, J., McGhee, E.J., Dhayade, S., Nixon, C., Mackey, J.B., Santi, A. et al. (2017). Tumor matrix stiffness promotes metastatic cancer cell interaction with the endothelium. *EMBO J.* 36, 2376-2389.
- Reis-Filho, J.S. et Tutt, A.N. (2008). Triple negative tumors: a critical review. *Histopathology* 52, 108-118.
- Repa, J.J. et Mangelsdorf, D.J. (1999). Nuclear receptor regulation of cholesterol and bile acid metabolism. *Curr. Opin. Biotechnol.* 10, 557-563.
- Rodermann, H.P. et Müller, G.A. (1991). Characterization of human renal fibroblasts in health and disease : II. In vitro growth, differentiation, and collagen synthesis of fibroblasts from kidneys with interstitial fibrosis. *Am. J. Kidney Dis.* 17, 684-686.
- Rønnov-Jessen, L. et Petersen, O.W. (1993). Induction of alpha-smooth muscle actin by transforming growth factor-beta 1 in quiescent human breast gland fibroblasts. Implications for myofibroblast generation in breast neoplasia. *Lab. Invest.* 68, 696-707.
- Rønnov-Jessen, L., Petersen, O.W. et Bissell, M.J. (1996). Cellular changes involved in conversion of normal to malignant breast: importance of the stromal reaction. *Physiol. Rev.* 76, 69-125.
- Sablin, E.P., Krylova, I.N., Fletterick, R.J. et Ingraham, H.A. (2003). Structural basis for ligand-independent activation of the orphan nuclear receptor LRH-1. *Mol. Cell* 11, 1575-1585.
- Santi, A., Kugeratski, F.G. et Zanivan, S. (2018). Cancer associated fibroblasts: the architects of stroma remodeling. *Proteomics* 18, e1700167.
- Sappino, A.P., Skalli, O., Jackson, B., Schürch, W. et Gabbiani, G. (1988). Smooth-muscle differentiation in stromal cells of malignant and non-malignant breast tissues. *Int. J. Cancer* 41, 707-712.
- Satelli, A. et Li, S. (2011). Vimentin in cancer and its potential as a molecular target for cancer therapy. *Cell Mol. Life Sci.* 68, 3033-3046.

- Scheller, J., Chalaris, A., Schmidt-Arras, D. et Rose-John, S. (2011). The pro- and anti-inflammatory properties of the cytokine interleukin-6. *Biochim. Biophys. Acta* 1813, 878-888.
- Schoojans, K., Dubuquoy, L., Mebis, J., Fayard, E., Wendling, O., Haby, C., Geboes, K. et Auwerx, J. (2005). Liver receptor homolog 1 contributes to intestinal tumor formation through effects on cell cycle and inflammation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 102, 2058-2062.
- Schwaderer, J., Gaiser, A.K., Phan, T.S., Delgado, M.E. et Brunner, T. (2017). Liver receptor homolog-1 (NR5a2) regulates CD95/Fas ligand transcription and associated T-cell effector functions. *Cell Death Dis.* 8, e2745.
- Segraves, W. (1991). Something old, some things new: the steroid receptor superfamily in drosophila. *Cell* 67, 225-228.
- Servais, C. et Erez, N. (2013). From sentinel cells to inflammatory culprits: cancer-associated fibroblasts in tumor-related inflammation. *J. Pathol.* 229, 198-207.
- Sever, R. et Glass, C.K. (2013). Signaling by nuclear receptors. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 5, a016709.
- Shao, Z.M., Nguyen, M. et Barsky, S.H. (2000). Human breast carcinoma desmoplasia is PDGF initiated. *Oncogene* 19, 4337-4345.
- Shibuya, M. et Claesson-Welsh, L. (2006). Signal transduction by VEGF receptors in regulation of angiogenesis and lymphangiogenesis. *Exp. Cell Res.* 312, 549-560.
- Siegel, R.L., Miller, K.D. et Jemal, A. (2019). Cancer statistics, 2019. *CA Cancer J. Clin.* 69, 7-34.
- Sirianni, R., Seely, J.B., Attia, G., Stocco, D.M., Carr, B.R., Pezzi, V. et Rainey, W.E. (2002). Liver receptor homologue-1 is expressed in human steroidogenic tissues and activates transcription of genes encoding steroidogenic enzymes. *J. Endocrinol.* 174, R13-R17.
- Sørli, T., Perou, C.M., Tibshirani, R., Aas, T., Geisler, S., Johnsen, H., Hastie, T., Eisen, M.B., van de Rijn, M., Jeffrey, S.S. et al. (2001). Gene expression patterns of breast carcinomas distinguish tumor subclasses with clinical implications. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 98, 10869-10874.
- Sørli, T., Tibshirani, R., Parker, J., Hastie, T., Marron, J.S., Nobel, A., Deng, S., Johnsen, H., Pesich, R., Geisler, S. et al. (2003). Repeated observation of breast tumor subtypes in independent gene expression data sets. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 100, 8418-8423.
- Sotiriou, C. et Pusztai, L. (2009). Gene-expression signatures in breast cancer. *N. Engl. J. Med.* 360, 790-800.
- Spaeth, E.L., Dembinski, J.L., Sasser, A.K., Watson, K., Klopp, A., Hall, B., Andreeff, M. et Marini, F. (2009). Mesenchymal stem cell transition to tumor-associated fibroblasts contributes to fibrovascular network expansion and tumor progression. *PLoS One* 4, e4992.

- Stein, S. et Schoonjans, K. (2015). Molecular basis for the regulation of the nuclear receptor LRH-1. *Curr. Opin. Cell Biol.* 33, 26-34.
- Stergiopoulos, A. et Politis, P.K. (2016). Nuclear receptor NR5A2 controls neural stem cell fate decisions during development. *Nat. Commun.* 7, 12 230.
- Strutz, F., Zeisberg, M., Hemmerlein, B., Sattler, B., Hummel, K., Becker, V. et Müller, G.A. (2000). Basic fibroblast growth factor expression is increased in human renal fibrogenesis and may mediate autocrine fibroblast proliferation. *Kidney Int.* 57, 1521-1538.
- Tang, X., Hou, Y., Yang, G., Wang, X., Tang, S., Du, Y.E., Yang, L., Yu, T., Zhang, H., Zhou, M. et al. (2016). Stromal miR-200s contribute to breast cancer cell invasion through CAF activation and ECM remodeling. *Cell Death Differ.* 23, 132-145.
- Tao, L., Huang, G., Song, H., Chen, Y. et Chen, L. (2017). Cancer associated fibroblasts: an essential role in the tumor microenvironment. *Oncol. Lett.* 14, 2611-2620.
- Thiruchelvam, P.T., Lai, C.F., Hua, H., Thomas, R.S., Hurtado, A., Hudson, W., Bayly, A.R., Kyle, F.J., Periyasamy, M., Photiou, A. et al. (2011). The liver receptor homolog-1 regulates estrogen receptor expression in breast cancer cells. *Breast Cancer Res. Treat.* 127, 385-396.
- Tlsty, T.D. et Hein, P.W. (2001). Know thy neighbor: stromal cells can contribute oncogenic signals. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 11, 54-59.
- Tomasek, J.J., Gabbiani, G., Hinz, B., Chaponnier, C. et Brown, R.A. (2002). Myofibroblasts and mechano-regulation of connective tissue remodelling. *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.* 3, 349-363.
- Troester, M.A., Herschkowitz, J.I., Oh, D.S., He, X., Hoadley, K.A, Barbier, C.S. et Perou, C.M. (2006). Gene expression patterns associated with p53 status in breast cancer. *BMC Cancer* 6, 276.
- Tsukada, T., McNutt, M.A., Ross, R. et Gown, A.M. (1987). HHF35, a muscle actin-specific monoclonal antibody. II. Reactivity in normal, reactive, and neoplastic human tissues. *Am. J. Pathol.* 127, 348-402.
- Turner, N., Lambros, M.B., Horlings, H.M., Pearson, A., Sharpe, R., Natrajan, R., Geyer, F.C., van Kouwenhove, M., Kreike, B., Mackay, A. et al. (2010). Integrative molecular profiling of triple negative breast cancers identifies amplicon drivers and potential therapeutic targets. *Oncogene* 29, 2013-2023.
- Ueda, H., Sun, G.C., Murata, T. et Hirose, S. (1992). A novel DNA-binding motif abuts the zinc finger domain of insect nuclear hormone receptor FTZ-F1 and mouse embryonal long terminal repeat-binding protein. *Mol. Cell. Biol.* 12, 5667-5672.
- Ueki, N., Nakazato, M., Ohkawa, T., Ikeda, T., Amuro, Y., Hada, T. et Higashino, K. (1992). Excessive production of transforming growth-factor beta 1 can play an important role in the development of tumorigenesis by its action for angiogenesis: validity of neutralizing antibodies to block tumor growth. *Biochim. Biophys. Acta* 1137, 189-196.

- Waks, A.G. et Winer, E.P. (2019). Breast cancer treatment: a review. *JAMA* 321. 288-300.
- Wang, S., Zou, Z., Luo, X., Mi, Y., Chang, H. et Xing, D. (2018 b). LRH1 enhances cell resistance to chemotherapy by transcriptionally activating MDC1 expression and attenuating DNA damage in human breast cancer. *Oncogene* 37, 3243-3259.
- Wang, S.L., Zheng, D.Z., Lan, F.H., Deng, X.J., Zeng, J., Li, C.J., Wang, R. et Zhu, Z.Y. (2008). Increased expression of hLRH-1 in human gastric cancer and its implication in tumorigenesis. *Mol. Cell. Biochem.* 308, 93-100.
- Wang, W., Zhang, C., Marimuthu, A., Krupka, H.I., Tabrizizad, H.I., Shelloe, R., Mehra, U., Eng, K., Nguyen, H., Settachatgul, C. et al. (2005). The crystal structures of human steroidogenic factor-1 and liver receptor homologue-1. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 102, 7505-7510.
- Wang, Z., Wu, D., Ng, C.F., Teoh, J.Y., Yu, S., Wang, Y. et Chan, F.L. (2018a). Nuclear receptor profiling in prostatospheroids and castration-resistant prostate cancer. *Endocr. Relat. Cancer* 25, 35-50.
- Wang, Z.N., Bassett, M. et Rainey, W.E. (2001). Liver receptor homologue-1 is expressed in the adrenal and can regulate transcription of 11 β -hydroxylase. *J. Mol. Endocrinol.* 27, 255-258.
- Wei, C.Y., Tan, Q.X., Zhu, X., Qin, Q.H., Zhu, F.B., Mo, Q.G. et Yang, W.P. (2015). Expression of CDKN1A/p21 and TGFBR2 in breast cancer and their prognostic significance. *Int. J. Clin. Exp. Pathol.* 8, 14619-14629.
- Weigelt, B., Baehner, F.L. et Reis-Filho, J.S. (2010). The contribution of gene expression profiling to breast cancer classification, prognostication and prediction: a retrospective of the last decade. *J. Pathol.* 220, 263-280.
- Welch, D.R., Fabra, A. et Nakajima, M. (1990). Transforming growth factor beta stimulates mammary adenocarcinoma cell invasion and metastatic potential. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 87, 7678-7682.
- Wiseman, B.S. et Werb, Z. (2002). Stromal effects on mammary gland development and breast cancer. *Science.* 296, 1046-1049.
- Xiao, L., Wang, Y., Liang, W., Liu, L., Pan, N., Deng, H., Li, L., Zou, C., Chan, F.L. et Zhou, Y. (2018). LRH-1 drives hepatocellular carcinoma partially through induction of c-myc and cyclin E1, and suppression of p21. *Cancer Manag. Res.* 10, 2389-2400.
- Xu, J., Chen, Y., Huo, D., Khramtsov, A., Khramtsova, G., Zhang, C., Goss, K.H. et Olopade, O.I. (2015). β -catenin regulates c-Myc and CDKN1A expression in breast cancer cells. *Mol. Carcinog.* 55, 431-439.
- Xu, P., Oosterveer, M.H., Stein, S., Demagny, H., Ryu, D., Moullan, N., Wang, Z., Can, E., Zamboni, N., Comment, A. et al. (2016). LRH-1-dependent programming of mitochondrial glutamine processing drives liver cancer. *Genes Dev.* 30, 1255-1260.

- Yu, Y., Xiao, C.H., Tan, L.D., Wang, Q.S., Li, X.Q. et Feng, Y.M. (2016). Cancer-associated fibroblasts induce epithelial-mesenchymal transition of breast cancer cells through paracrine TGF- β signalling. *Br. J. Cancer* 110, 724-732.
- Zaman, M.H., Trapani, L.M., Sieminski, A.L., Mackellar, D., Gong, H., Kamm, R.D., Wells, A., Lauffenburger, D.A. et Matsudaira, P. (2006). Migration of tumor cells in 3D matrices is governed by matrix stiffness along with cell-matrix adhesion and proteolysis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 103, 10889-10894.
- Zeisberg, E.M., Potenta, S., Xie, L., Zeisberg, M. et Kalluri, R. (2007). Discovery of endothelial to mesenchymal transition as a source for carcinoma-associated fibroblasts. *Cancer Res.* 67, 10123-10128.
- Zhang, C., Large, M.J., Duggavathi, R., DeMayo, F.J., Lydon, J.P., Schoonjans, K., Kovanci, E. et Murphy, B.D. (2013). Liver receptor homolog-1 is essential for pregnancy. *Nat. Med.* 19, 1061-1066.
- Zhang, J., Liu, J. (2013). Tumor stroma as targets for cancer therapy. *Pharmacol. Ther.* 137, 200-215.
- Zhou, J., Suzuki, T., Kovacic, A., Saito, R., Miki, Y., Ishida, T., Moriya, T., Simpson, E.R., Sasano, H. et Clyne, C.D. (2005). Interactions between prostaglandin E2, liver receptor homologue-1, and aromatase in breast cancer. *Cancer Res.* 65, 657-663

